

HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA

**INSTITUTO MAIMÓNIDES DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE CÓRDOBA  
(IMIBIC)**

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**REGULACIÓN DE NOS-3 DURANTE LA  
MUERTE HEPATOCELULAR INDUCIDA  
POR ÁCIDOS BILIARES**

**Sandra González Rubio**

Córdoba 2017

TITULO: *Regulación de NOS-3 durante la muerte hepatocelular inducida por ácidos biliares*

AUTOR: *Sandra González Rubio*

---

© Edita: UCOPress. 2017  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



# REGULACIÓN DE NOS-3 DURANTE LA MUERTE HEPATOCELULAR INDUCIDA POR ÁCIDOS BILIARES

Memoria presentada por

**Sandra González Rubio**

Licenciada en Biología, para optar al grado de

**Doctor en Biología**

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de los Drs. Manuel de la Mata García, Gustavo Ferrín Sánchez y Jordi Muntané Relat en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

Programa de Doctorado de Biomedicina.

La doctoranda,



Sandra González Rubio

Directores



Manuel de la Mata García



Gustavo Ferrín Sánchez



Jordi Muntané Relat





**TÍTULO DE LA TESIS:** "Regulación de NOS-3 durante la muerte hepatocelular inducida por ácidos biliares"

**DOCTORANDO/A:** Sandra González Rubio

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo de investigación que se presenta es un trabajo original que ha permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos intracelulares específicos relacionados con el desarrollo de la colestasis hepática y la participación de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS-3) en este proceso.

Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas de reconocido prestigio internacional (*Chemical Research in Toxicology, Toxicology and Applied Pharmacology, Biochemical Pharmacology, Plos One*) y tienen un evidente carácter traslacional, proporcionando nuevas dianas terapéuticas de gran relevancia para el tratamiento de la enfermedad hepática colestásica. En este sentido, cabe señalar la solicitud de tres patentes relacionadas con el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de la colestasis (P201530576, P201530577 y P201531689).

Asimismo, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. El desarrollo de la tesis ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que la habilitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos artículos científicos y proyectos de investigación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Cordoba, a 26 de Junio de 2017.

Firma de/del los director/es:

Manuel de la Mata García

Gustavo Ferrín Sánchez

Jordi Muntané Relat



# **INDICE DE CONTENIDOS**





<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>I. RESUMEN/SUMMARY</b> .....	<b>11</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>1. El hígado</b> .....	<b>23</b>
1.1. Definición y fisiología hepática.....	23
1.2. Vascularización hepática.....	24
1.3. Tipos celulares.....	25
1.3.1. Células parenquimales.....	26
1.3.2. Células no parenquimales.....	28
1.4. Estructura histológica.....	30
1.5. Anatomía de la vía biliar.....	31
<b>2. La bilis</b> .....	<b>32</b>
2.1. Composición de la bilis.....	32
2.2. Ácidos biliares. Estructura química.....	32
2.3. Biosíntesis de los ácidos biliares.....	33
2.4. Biotransformación y circulación enterohepática de los ácidos biliares.....	37
2.5. Papel fisiológico de los ácidos biliares.....	41
2.6. Regulación de la síntesis de los ácidos biliares.....	42
2.7. Toxicidad de las sales biliares.....	44
<b>3. Colestasis</b> .....	<b>45</b>
3.1. Definición.....	45
3.2. Clasificación de los desórdenes colestásicos.....	46
3.3. Mecanismo molecular de citotoxicidad hepática mediado por los ácidos biliares.....	52
3.3.1. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.....	53
3.3.1.1. Generación fisiológica de especies reactivas de oxígeno.....	53
3.3.1.2. Estrés oxidativo y defensa antioxidante celular.....	58
3.3.1.3. Estrés oxidativo y daño hepático en la colestasis.....	59
3.3.1.4. Estrategias antioxidantes.....	64
3.3.2. Muerte celular.....	72
3.3.2.1. Apoptosis hepatocelular.....	72
3.3.2.2. Necrosis hepatocelular.....	75
3.4. Ácido glicoquenodesoxicólico.....	77

3.5.Efectos terapéuticos de las sales biliares.....	79
<b>4. Óxido nítrico.....</b>	<b>84</b>
4.1.Generación fisiológica de especies reactivas de nitrógeno.....	84
4.2.Mecanismos de acción del ON.....	86
4.3.Óxido nítrico y daño hepático.....	90
4.4.Papel del ON durante la colestasis.....	92
4.5.Caracterización del promotor de NOS-3.....	95
<b>5. Calcio.....</b>	<b>104</b>
5.1.Sistemas de transporte de calcio.....	104
5.1.1. Transporte de calcio al citoplasma.....	105
5.1.2. Transporte de calcio a la mitocondria.....	107
5.1.3. Transporte de calcio al núcleo.....	107
5.2.El calcio en el hígado.....	108
5.3.Papel del calcio durante la colestasis.....	111
5.4.El calcio y su relación con la actividad NOS.....	115
<b>6. El ciclo celular y la colestasis.....</b>	<b>116</b>
6.1.Puntos de control del ciclo celular.....	117
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>123</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>129</b>
<b>1. Materiales y reactivos.....</b>	<b>131</b>
<b>2. Aparatos.....</b>	<b>134</b>
<b>3. Cultivos celulares. Estudios.....</b>	<b>136</b>
3.1. Cultivo celular.....	137
3.2. Obtención de la línea celular pGL4-NOS3.....	138
3.3. Secuenciación.....	139
3.4. Digestión de los plásmidos.....	139
3.5. Purificación de los productos de la digestión.....	142
3.6. Cuantificación del ADN.....	143
3.7. Ligación del pNOS-3 en el vector pGL4.20.....	144
3.8. Cultivo bacteriano. Preparación de medio y placas.....	145
3.9. Transformación bacteriana y selección de clones.....	145
3.10. Conservación de las clones bacterianos de interés.....	147
3.11. Aislamiento y purificación del ADN plasmídico.....	147
3.12. Comprobación de la ligación.....	148
3.13. Transfección celular.....	150

3.14. Subcultivo de las líneas celulares.....	151
3.15. Recuento celular.....	151
3.16. Criopreservación y descongelación celular.....	153
3.17. Procedimiento experimental. Tratamientos.....	154
3.18. Recogida del medio de cultivo y preparación de los extractos celulares.....	155
3.19. Preparación de los extractos nucleares.....	156
3.20. Crecimiento celular.....	156
3.20.1. Determinación del crecimiento celular por el método de exclusión con azul tripán.....	156
3.20.2. Determinación de la proliferación celular mediante el ensayo de MTT.....	157
<b>4. Animales. Estudio in vivo.....</b>	<b>159</b>
4.1. Procedimiento quirúrgico y diseño experimental.....	159
4.2. Obtención y conservación de las muestras.....	161
4.3. Preparación de los lisados de hígado de rata.....	162
<b>5. Cuantificación de proteínas.....</b>	<b>163</b>
<b>6. Evaluación de la producción de estrés oxidativo.....</b>	<b>163</b>
<b>7. Actividad enzimática de los complejos respiratorios mitocondriales.....</b>	<b>165</b>
7.1. Purificación de mitocondrias.....	165
7.2. Actividad enzimática de los complejos respiratorios.....	166
7.2.1. Actividad NADH-Deshidrogenasa sensible a rotenona o Complejo I.....	167
7.2.2. Actividad Succinato-Deshidrogenasa o complejo II.....	168
7.2.3. Actividad Citocromo c Oxidasa o complejo IV.....	169
7.2.4. Actividad CI+CIII.....	170
7.2.5. Actividad CII+CIII.....	171
7.2.6. Actividad Citrato sintasa (CS).....	172
<b>8. Análisis de la muerte celular.....</b>	<b>173</b>
8.1. Muerte celular por apoptosis.....	173
8.2. Muerte celular por necrosis.....	174
<b>9. Estudio cinético de la concentración de calcio intracelular.....</b>	<b>175</b>
<b>10. Ensayo de la actividad del promotor de la NOS-3.....</b>	<b>176</b>
<b>11. Análisis de la expresión génica.....</b>	<b>177</b>
11.1. Aislamiento del ARN total.....	177

11.2. Tratamiento con ADNasa.....	179
11.3. PCR cuantitativa en tiempo real.....	180
11.3.1. Reacción de qRT-PCR.....	182
11.3.2. Diseño de cebadores.....	185
<b>12. Electroforesis y western blot.....</b>	<b>188</b>
12.1. Electroforesis de proteínas en SDS- PAGE.....	188
12.2. Elaboración de los geles.....	189
12.3. Preparación de las muestras. Electroforesis.....	190
12.4. Transferencia de las proteínas.....	191
12.5. Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa.....	192
12.6. Inmunodetección y revelado.....	193
12.7. Cuantificación de las bandas de proteínas.....	195
12.8. Reutilización de las membranas.....	195
<b>13. Producción de óxido nítrico.....</b>	<b>195</b>
<b>14. Identificación de los posibles sitios de unión para factores de transcripción en el promotor de NOS-3.....</b>	<b>197</b>
<b>15. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética.....</b>	<b>197</b>
15.1. Obtención de los oligonucleótidos.....	198
15.2. Marcaje y purificación de los oligonucleótidos.....	199
15.3. Incubación del extracto nuclear con el oligonucleótido marcado.....	199
15.4. Electroforesis, fijación y secado del gel.....	200
15.5. Revelado y cuantificación de las bandas.....	201
<b>16. Inmunoprecipitación de la cromatina.....</b>	<b>201</b>
16.1. Entrecruzamiento de la cromatina y aislamiento de los núcleos.....	202
16.2. Sonicación de la cromatina.....	203
16.3. Comprobación de la sonicación.....	204
16.4. Bloqueo de las dynabeads y preclarificado de la cromatina.....	205
16.5. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	206
16.6. Análisis del CHIP mediante qRT-PCR absoluta.....	208
<b>17. Estudio Histológico.....</b>	<b>211</b>
17.1. Toma de muestras y fijación del tejido.....	211
17.2. Deshidratación y aclarado del tejido.....	211
17.3. Montaje de los bloques de parafina.....	212
17.4. Corte histológico.....	212
17.5. Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	212

17.6. Tinción con Tricómico de Masson.....	213
17.7. Inmunohistoquímica.....	214
<b>18. Análisis estadístico.....</b>	<b>215</b>
<b>19. Redacción y presentación gráfica.....</b>	<b>216</b>
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>219</b>
<b>1. Estrés oxidativo y muerte celular durante la colestasis ! " # \$ % &amp; ' ....</b>	<b>221</b>
1.1. GCDCA induce la muerte celular asociada a estrés oxidativo y desregulación del sistema antioxidante.....	221
1.2. GCDCA altera la actividad del sistema OXPHOS.....	223
1.3. El estrés oxidativo inducido por GCDCA regula negativamente la actividad transcripcional de NOS-3.....	225
1.4. La inhibición de la actividad de NOS-3 se relaciona con un aumento de la muerte celular.....	227
<b>2. Movilización de calcio durante la colestasis experimental # ! " # \$ % &amp; ' .....</b>	<b>229#</b>
2.1. GCDCA induce alteraciones en la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ .....	229
2.2. La regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ por GCDCA es dependiente del estrés oxidativo.....	233
2.3. Papel de la $[Ca^{2+}]_i$ en la regulación de NOS-3.....	235
2.4. Papel de la $[Ca^{2+}]_i$ en la regulación de la muerte celular inducida por GCDCA.....	236
<b>3. Regulación de la expresión de NOS-3 durante la colestasis experimental ! " # \$ % &amp; ' .....</b>	<b>238#</b>
3.1. Identificación de TFBS candidatos en el pNOS-3.....	238
3.2. cJun y cFos son subunidades del complejo AP-1.....	239
3.3. El estrés oxidativo inducido por GCDCA se relaciona con la expresión y activación de Sp1 y AP-1.....	240
3.4. GCDCA aumenta la unión de Sp1 y de AP-1 a sus sitios diana en el pNOS-3.....	242
3.5. GCDCA no afecta a la unión de los FTs GATA-1/4 y MAZ al pNOS-3.....	244
3.6. Sp1 y AP-1 regulan la expresión de NOS-3 durante la citotoxicidad por GCDCA.....	247
3.7. La inhibición de AP-1 y SP1 protege frente a la muerte celular inducida por GCDCA.....	253
3.8. SR 11302 protege durante la colestasis experimental a través	

de la recuperación de la expresión de NOS-3.....	255
<b>4. Regulación de la expresión de NOS-3 durante la colestasis experimental ! " # \$ % ' .....</b>	<b>258</b>
4.1. El modelo de colestasis <i>in vivo</i> reproduce las observaciones realizadas en la línea celular HepG2.....	258
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>265</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>293</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>297</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>349</b>







## **ABREVIATURAS**



**Abs:** Absorbancia  
**Ac-DEVD-AFC:** N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometil coumarina  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ADNasa:** Enzima desoxirribonucleasa I  
**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico copia  
**ADPH:** 10-Acetil-3,7-dihidroxifenoxacino  
**AE2:** Isoforma 2 del intercambiador de aniones cloruro-bicarbonato  
**AKR1C4:** 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa  
**AKR1D1:**  $\Delta$ 4-3-oxoesteroide-5 $\beta$ -reductasa  
**ALT:** Alanina transaminasa  
**AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico  
**AMPK:** Proteína quinasa activada por AMP  
**AP-1:** Proteína activadora 1  
**Aprox:** Aproximadamente  
**APS:** Persulfato amónico  
**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero  
**ASBT:** Transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio  
**AST:** Aspartato aminotransferasa  
**AT:** Ácido tolfenámico  
**ATP:** Adenosin trifosfato  
**BAAT:** Ácido-amino-N-acetiltransferasa  
**BACS:** Coenzima A sintetasa  
**BAREs:** Elementos de respuesta de los ácidos biliares  
**BD:** Bilirrubina directa  
**BDL:** Ligadura del conducto biliar  
**BH<sub>4</sub>:** Tetrahidrobiopterina  
**BSA:** Albúmina de suero bovino  
**BSEP:** Bomba exportadora de sales biliares  
**BT:** Bilirrubina total  
**°C:** Grados centígrados  
**CA:** Ácido cólico  
**[Ca<sup>2+</sup>]:** Concentración intracelular de calcio  
**CAK:** Quinasa activadora de las cdk  
**Cat:** Catalasa  
**CBP:** Cirrosis biliar primaria  
**CDCA:** Ácido quenodesoxicólico  
**CDK:** Quinasa dependiente de ciclina  
**Cdki:** Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina  
**CEP:** Colangitis esclerosante primaria

**CFTR:** Regulador transmembrana de fibrosis quística  
**CHAPS:** 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1 propansulfonato  
**ChIP:** Inmunoprecipitación de cromatina  
**CI:** Complejo I  
**CII:** Complejo II  
**CIII:** Complejo III  
**CIE:** Colestasis intrahepática del embarazo  
**CIFP:** Colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1-3  
**CIRB:** Colestasis intrahepática recurrente benigna  
**CIV:** Complejo IV  
**CKK:** Enzima colecistocinina  
**Cl:** Ión cloruro  
**CPD:** Complejo de la piruvato deshidrogenasa  
**CS:** Citrato sintasa  
**Ct:** Ciclo umbral  
**CTE:** Cadena de transporte electrónico  
**Cu:** Curcumina  
**CV:** Complejo V  
**CYP27A1:** Esterol 27 $\alpha$ -hidroxilasa  
**CYP7A1:** Colesterol 7 $\alpha$ -coSlesterol hidroxilasa  
**CYP7B1:** Oxiesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa  
**CYP8B1:** Esterol 12 $\alpha$ -hidroxilasa  
**DAG:** Diacilglicerol  
**DAMPs:** Patrones moleculares asociados al daño  
**DCA:** Ácido desoxicólico  
**DCPIP:** 2,6 diclorofenol-indofenol  
**DHCA:** 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-ácido-5 $\beta$ -colestanoico  
**DHE:** Dihidroetidio  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DO:** Densidad óptica  
**DTT:** Ditiotriol  
**DTNB:** Ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzónico  
**ECACC:** Colección Europea de Cultivos Celulares  
**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético  
**E2F:** Factor de elongación de la transcripción  
**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico  
**EGTA:** Ácido etilenglicoltetraacético  
**EHGNA:** Enfermedad de hígado graso no alcohólico  
**EHNA:** Esteatohepatitis no alcohólica

**ERK1/2:** Quinasas reguladas por señales extracelulares  
**ERO:** Especie reactiva de oxígeno  
**FAD:** Flavín adenina dinucleótido  
**FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas  
**FMN:** Flavín mononucleótido  
**fmol:** Fentomol  
**FPM:** Factor promotor de la mitosis  
**FPR:** Factor promotor de la replicación  
**FQR:** Flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa  
**FT:** Factores de transcripción  
**FTF:**  $\alpha$ -fetoproteína  
**FXR:** Receptor X farnesoide  
**g:** Fuerza centrífuga relativa  
**GATA-1:** Erythroid transcription factor  
**GCA:** Ácido glicocólico  
**GCDCA:** Ácido glicoquenosodesoxicólico  
**GGT:**  $\gamma$ -glutamyltransferasa  
**GMPc:** Guanosina monofosfato cíclica  
**GPCR:** Receptor acoplado a proteína G  
**GPDM:** Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa de membrana  
**GPx:** Glutación peroxidasa  
**GSH:** Glutación reducido  
**GSSG:** Glutación oxidado  
**h:** Horas  
**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** Ión bicarbonato  
**H<sub>2</sub>DCFDA:** 2,7 diclorodihidrofluoresceína diacetato  
**HGF:** Factor de crecimiento de hepatocito  
**HMGB1:** Proteína del grupo de alta movilidad-1  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno  
**HRP:** Peroxidasa de rábano  
**HRPT:** Hipoxantina fosforribosiltransferasa  
**HSD3B7:** Enzimas microsomales 3 $\beta$ -hidroxi- $\Delta$ 5-C27-esteroideisomerasa  
**HSDH:** Enzimas hidroxisteroide deshidrogenasas  
**HURS:** Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba  
**IMIBIC:** Instituto Maimonides de Investigación Biomédica de Córdoba  
**InsP<sub>3</sub>:** Inositol 1,4,5-trifosfato  
**IP<sub>3</sub>R:** Receptor inositol 1,4,5-trifosfato  
**Kg:** Kilogramo  
**L:** Anchura del paso de luz

**l:** Litro

**LB:** Luria-Bertani

**LCA:** Ácido litocólico o 3 $\alpha$ -hidroxi-ácido 5 $\beta$  colanoico

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**LRH-1:** Homólogo del receptor hepático 1

**Luc2:** Gen reportero de la luciferasa de luciérnaga

**M:** Molar

**mA:** Miliamperios

**MAPK:** Proteínas quinasas activadoras de mitógeno

**MAZ:** Myc asociado a dedos de zinc

**MCS:** Sitio de clonación múltiple

**MDA:** Malonaldehído

**MEM:** Medio Esencial Mínimo Eagle

**Mg:** Magnesio

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**Min:** Minutos

**MitA:** Mitramicina A

**ml:** Mililitro

**mm:** Milímetro

**mm<sup>2</sup>:** Milímetro cuadrado

**MnTBAP:** Tetrakis o ácido 4-benzoico porfirina de manganeso

**MRPs:** Proteínas asociadas a la resistencia a multidroga

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tizolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium

**mU:** Miliunidades

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno

**NAC:** N-acetilcisteína

**NASH:** Enfermedad de hígado graso no alcohólica

**NCBI:** Centro nacional para la información biotecnológica

**ng:** Nanogramos

**nM:** Nanomolar

**nm:** Nanómetros

**NOS:** Óxido nítrico sintasa

**NOS<sub>e</sub>:** Óxido nítrico sintasa endotelial o NOS-3

**NOS<sub>i</sub>:** Óxido nítrico sintasa inducible o NOS-2

**NOS<sub>n</sub>:** Óxido nítrico sintasa neuronal o NOS-1

**NTCP:** Proteína cotransportadora de ácido taurocólico dependiente de sodio

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido

**OAA:** Oxalacetato

**OAT:** Transportador de aniones orgánicos independiente de sodio  
**OATP:** Polipéptido transportador de aniones orgánicos independiente de sodio  
**OCT1:** Transportador de cationes orgánicos poliespecíficos  
**OGDH:** 2-oxoglutarato deshidrogenasa  
**OH•:** Radical hidroxilo  
**ON:** Óxido nítrico  
**ONOO•:** Peroxinitrito  
**OST:** Transportador de solutos orgánicos  
**<sup>32</sup>P:** Isótopo radioactivo de fósforo  
**PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida  
**pb:** Pares de bases  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**PDH:** Piruvato deshidrogenasa  
**PIP2:** Fosfatidilinositol-4-5 bifosfato  
**PKA:** Proteína quinasa C  
**PKC:** Proteína quinasa C  
**PLC:** Fosfolipasa C  
**PM:** Peso molecular  
**pmol:** picomol  
**pNOS-3:** Región promotora de NOS-3  
**pRb:** Proteína del retinoblastoma  
**PRDX:** Peroxirredoxina  
**Pte:** pendiente  
**PTP:** Poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial  
**PXR:** Receptor nuclear pregnano X  
**Q:** Quercetina  
**qRT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real  
**RARE:** Elementos de respuesta de los ácidos retinoicos  
**RE:** Reticulo endoplasmático  
**Rluc:** Luciferasa Renilla  
**RNO:** Especie reactiva de nitrógeno  
**RPL13A:** Proteína ribosomal L13A  
**rpm:** Revoluciones por minuto  
**RS:** Reticulo sarcoplásmico  
**RTK:** Receptor tirosina quinasa  
**RyRs:** Receptor de riadonina  
**s:** Segundos  
**SAPK:** Proteína quinasa activada por estrés  
**SCAI:** Servicio Central de Apoyo a la Investigación



**SDS:** Dodecilsulfato sódico  
**SERCA:** ATP-asa transportadora de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático/sarcoplásmico  
**SFB:** Suero fetal bovino  
**SOD:** Superóxido dismutasa  
**Sp1:** Proteína específica 1  
**TA:** Temperatura ambiente  
**TCA:** Ácido taurocólico  
**TCDCA:** Ácido tauroquenodesoxicólico  
**TD:** Tiempo de duplicación celular  
**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina  
**TFBS:** Sitios de unión para factores de transcripción  
**TGR5:** Receptor de membrana de ácidos biliares acoplados a proteína G  
**THC:** 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxi-ácido-5 $\beta$ -colestanoico  
**TLCA:** Ácido taurolitocólico  
**Tm:** Temperatura de fusión o de melting  
**T4PNK:** Polinucleótido quinasa del fago T4  
**Ttx:** Timeleatoxina  
**U:** Unidad  
**U.A:** Unidades arbitrarias  
**UCO:** Universidad de Córdoba  
**UDCA:** Ácido ursodesoxicólico o 3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihidroxi-ácido 5 $\beta$ - colanoico  
**U.I:** Unidades internacionales  
**UQ<sub>1</sub>:** Coenzima Q<sub>10</sub> o ubiquinona  
**U.V:** Ultravioleta  
**V:** voltios  
**VHC:** Virus de la hepatitis C  
**VLCS:** Acil-coenzima A sintetasa de cadena larga  
 **$\mu\text{Ci}$ :** microcurio  
 **$\mu\text{g}$ :** Microgramos  
 **$\mu\text{l}$ :** Microlitros  
 **$\mu\text{M}$ :** Micromolar  
 **$\lambda$ :** Longitud de onda  
 **$\epsilon$ :** Coeficiente de extinción molar





# **I. RESUMEN/SUMMARY**



La enfermedad hepática colestásica se caracteriza por una alteración en la formación de la bilis, que viene acompañada o es causada por un defecto en la excreción de la misma hacia el canalículo biliar. Como resultado, se produce una alteración en la circulación enterohepática de los ácidos biliares, aumentando su concentración a nivel sérico y hepático. Las consecuencias de la colestasis no tratadas son severas y se asocian con el desarrollo de fibrosis, cirrosis, hipertensión portal, fallo hepático y la aparición de carcinoma hepatocelular y colangiocelular. En la actualidad, las opciones de tratamiento farmacológico para el manejo de las enfermedades colestásicas son muy limitadas. De ahí la importancia de disponer de un mayor conocimiento de los mecanismos a través de los cuales los ácidos biliares ejercen su efecto citotóxico, para poder así diseñar nuevas estrategias terapéuticas eficaces y seguras u optimizar las ya existentes. Numerosas pruebas experimentales han demostrado que el desarrollo de la enfermedad hepática colestásica se relaciona con diversos mecanismos celulares íntimamente relacionados, incluyendo la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la muerte celular.

El óxido nítrico (ON) se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina mediante la participación de la óxido nítrico sintasa (NOS), cuya activación depende de la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ). En el hígado, el ON desempeña un papel citoprotector o citotóxico en función de factores tales como su concentración, la fuente que lo genera y la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs). Diversos estudios han demostrado que la desregulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS-3) actúa como un factor clave durante la progresión del daño hepático. Sin embargo, el papel de la NOS-3 no ha sido claramente establecido durante la enfermedad hepática colestásica.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue clarificar los mecanismos moleculares que subyacen a la citotoxicidad hepatocelular

durante la enfermedad hepática colestásica, incluyendo la participación de NOS-3.

Los resultados obtenidos indican que la respuesta citotóxica al ácido biliar glicoquenodesoxicólico (GCDCA) se caracterizó por la alteración del sistema redox celular, la disminución de la actividad combinada de los complejos respiratorios II+III, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs), una mayor expresión y activación de los factores de transcripción (FTs) Sp1, cJun y cFos, así como una mayor capacidad de unión de los mismos a la región promotora de NOS-3 (pNOS-3), en las posiciones -1386, -632 y -104 para Sp1, y -666 para cJun y cFos. Esto se asoció con una disminución de la actividad del pNOS-3 y, en consecuencia, con una menor expresión/actividad de NOS-3. La disminución de la expresión de NOS-3 durante la toxicidad inducida por GCDCA coincidió con el descenso de la  $[Ca^{2+}]_i$ . El tratamiento antioxidante causó una menor activación de Sp1, cJun y cFos, previno la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$ , recuperó la actividad del pNOS-3 y la expresión/actividad de NOS-3 y redujo la muerte celular provocada por la acumulación de la sal biliar. De manera similar, la inhibición específica de Sp1 y AP-1 recuperó la expresión de NOS-3 y suprimió los efectos citotóxicos ejercidos por GCDCA. De manera complementaria, el bloqueo farmacológico de AP-1 con SR11302 redujo la expresión de ciclina D1, inducida por GCDCA y relacionada con su efecto deletéreo. La inhibición específica de la actividad NOS por L-NAME inhibió el efecto protector de SR11302. Cabe destacar que, en este modelo de colestasis, no fueron detectadas las isoformas neuronal e inducible de la NOS. La ligadura del conducto biliar en ratas confirmó los resultados del modelo *in vitro* relativos a la activación de los FTs, la reducción de la expresión de NOS-3 y el daño hepatocelular inducido por la obstrucción biliar.

Estos resultados proporcionan evidencias sobre la participación de SP-1 y AP-1 en la regulación de la expresión de NOS-3 y atribuye un papel crítico a la NOS-3 en la regulación de la expresión de la ciclina D1

durante el daño celular inducido por los ácidos biliares. La identificación de Sp1 y AP-1 como reguladores negativos de la expresión de NOS-3 representa un nuevo mecanismo por el que los ácidos biliares ejercen su efecto citotóxico, y proporciona nuevas dianas terapéuticas candidatas para el tratamiento de la enfermedad hepática colestásica.

**Palabras clave:** enfermedad hepática colestásica, óxido nítrico sintasa endotelial, óxido nítrico, estrés oxidativo, ácido glicoquenodesoxicólico, Sp1, cJun, cFos, ciclina D1.





Cholestatic liver diseases (CLDs) are characterized by an alteration in the bile formation, which is accompanied or caused by a defect in the excretion of bile into the biliary canaliculus. This results in the alteration of the enterohepatic circulation of bile acids, increasing their concentration at serum and hepatic level. The consequences of untreated cholestasis are severe and are associated with the development of fibrosis, cirrhosis, portal hypertension, hepatic failure and the development of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. Currently, the pharmacological options for the treatment of cholestatic diseases are very limited. In order to design safe and effective therapeutic strategies against CLDs or to optimize the existing ones, it is important to get a better knowledge about the mechanisms by which bile acids exert their cytotoxic effects. Research has shown that the development of CLD is related to several closely related cellular mechanisms, including mitochondrial dysfunction, oxidative stress and cell death.

Nitric oxide (NO) is a molecule synthesized from the amino acid L-arginine by the participation of nitric oxide synthases (NOS). In the liver NO can display either a cytoprotective or cytotoxic role, depending on factors such as its concentration, the generating source or the presence of reactive oxygen species (ROS). Several studies have shown that the expression deregulation of endothelial nitric oxide synthase (NOS-3; a calcium-dependent isoform of NOS) acts as a key factor during the progression of liver damage. However, the role of NOS-3 has not yet been clearly established during cholestatic liver disease.

The general objective of this doctoral thesis was to clarify the molecular mechanisms underlying the hepatocellular cytotoxicity during cholestatic liver disease that are associated with the NOS-3 expression regulation.

The results show that the cytotoxic response to glycochenodeoxycholic bile acid (GCDCA) was characterized by an alteration of the cellular redox system, a decrease in the combined

activity of respiratory complexes II+III, an increased expression and activation of the transcription factors (TFs) Sp1, cJun and cFos and a greater binding capacity of these at positions -1386, -632 and -104 for Sp1 and at position -666 for cJun and cFos, of the NOS-3 promoter (pNOS-3). This led to a pNOS-3 activity reduction and a consequent NOS-3 expression/activity decrease. In addition, the NOS-3 expression inhibition occurring during GCDCA-induced toxicity coincided with a drop in the intracellular concentration of calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ). The antioxidant treatment decreased the activation of TFs, prevented the reduction of  $[Ca^{2+}]_i$ , recovered the pNOS-3 activity and the NOS-3 expression/activity and reduced the cell death caused by GCDCA. Similarly, the specific inhibition of Sp1 and AP-1 suppressed the GCDCA cytotoxicity and it recovered the NOS-3 expression. The pharmacological blockade of AP-1 with SR11302 reduced the GCDCA-induced expression of the cell cycle regulator cyclin D1 related to its deleterious effect. Interestingly, the NOS activity inhibition by L-NAME suppressed the protective effect of SR11302. Since we failed to detect the expression of NOS isoforms different from NOS-3 in this model of cholestasis, this result directly involves NOS-3. Ligation of the bile duct in rats confirmed the results of the *in vitro* model concerning TFs activation, the reduction of NOS-3 expression and hepatocellular damage after obstruction. These results provide evidence about the involvement of SP-1 and AP-1 in the NOS-3 expression regulation and they attribute a critical role for NOS-3 in the regulation of cyclin D1 expression during cell damage induced by bile acids.

The identification of Sp1 and AP-1 as negative regulators of NOS-3 expression represents a new mechanism by which bile acids exert their cytotoxic effect. This could provide us new therapeutic targets for the treatment of CLDs.

**Keywords:** Cholestatic liver disease, endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, oxidative stress, glycochenodeoxycholic acid, Sp1, cJun, cFos, cyclin D1.





## **II. INTRODUCCIÓN**



# 1. EL HÍGADO

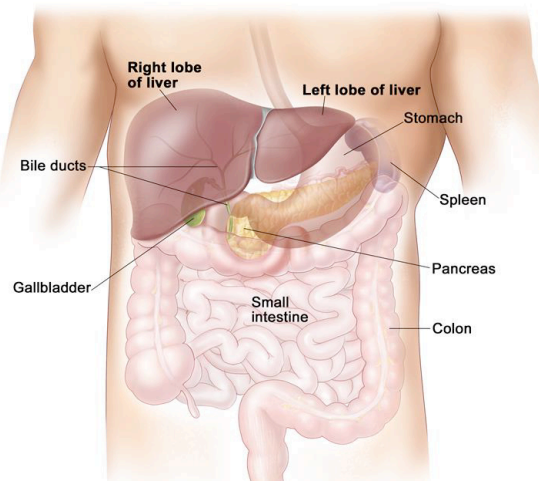
## 1.1 Definición y fisiología hepática

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo, presentando en el humano adulto un peso aproximado de 2,5 Kg. Se localiza en la región superior derecha de la cavidad abdominal, detrás de las costillas y de los cartílagos costales. Además, se encuentra separado de la cavidad pleural y de los pulmones por el diafragma, prolongándose por encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos (Fig.1).

Se han identificado más de 500 funciones vitales del hígado. Entre ellas, cabe destacar las siguientes:

- Producción de bilis, cuya función principal es transportar los productos de desecho y facilitar la reabsorción lipídica en el intestino delgado durante la digestión.
- Producción de proteínas para el plasma sanguíneo (albúmina,...).
- Producción de colesterol y lipoproteínas, requeridas para el transporte de las grasas.
- Conversión del exceso de glucosa en glucógeno y viceversa, en función de las necesidades metabólicas del organismo.
- Regulación de los niveles de aminoácidos en sangre.
- Regulación de los niveles de hierro en el organismo a través del procesamiento de la hemoglobina, encargada de su almacenamiento.

**Fig.1. El hígado en el cuerpo humano.**





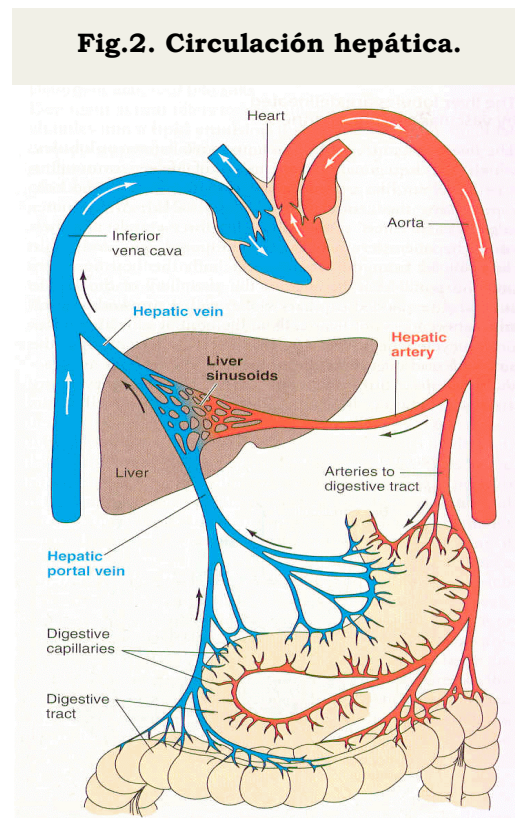
- Conversión del amoníaco tóxico en urea, un producto final del metabolismo de las proteínas que se excreta en la orina.
- Metabolización de fármacos y otras sustancias tóxicas, incrementando su hidrofilia para que resulten fácilmente excretables a nivel renal.
- Regulación de la coagulación sanguínea: es responsable de la síntesis de la mayoría de los factores de coagulación.
- Resistencia a las infecciones: produce factores de inmunidad y elimina los cuerpos extraños mediante la actividad de macrófagos residentes (células de Kupfer).

Debido a la multitud de funciones que realiza el hígado, resulta lógico entender que la enfermedad o disfunción hepática pueda convertirse en un problema de salud tan importante.

## 1.2 Vascularización hepática

La entrada de sangre al hígado depende de la arteria hepática y la vena porta que, junto con el conducto biliar, se localizan en la base del hígado constituyendo el denominado hilio hepático.

La arteria hepática abastece al hígado de sangre arterial y es responsable del 25% del flujo sanguíneo total que recibe este órgano. Al tratarse de sangre oxigenada, este suministro de sangre es muy importante; de hecho, contribuye con el 50% del oxígeno aportado por el flujo sanguíneo hepático. Respecto a la circulación venosa, la vena porta es la responsable del 75% restante de la sangre que fluye hacia el hígado,



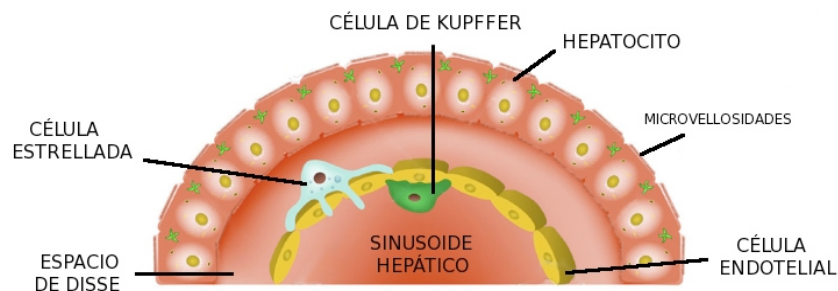
drenando casi toda la sangre procedente del intestino, estómago, páncreas, vesícula biliar y bazo. Se trata, por tanto, de sangre con baja presión parcial de oxígeno, cargada de nutrientes, los cuales son transportados y almacenados en el hígado, quedando así disponibles para los periodos de demanda energética. Además, la circulación venosa del hígado permite los procesos de transformación y detoxificación en los que dicho órgano participa.

En el hígado, ambos tipos de sangre (arterial y venosa) se mezclan y, tras ser filtrada, abandona el hígado a través de las venas hepáticas o suprahepáticas, drenando por último en la vena cava inferior (Gomes da Silveira, 2013) (Fig.2). La filtración de la sangre en el hígado tiene lugar en una serie de capilares denominados sinusoides hepáticos, que se encuentran dispuestos entre las láminas formadas por los hepatocitos, que constituyen el principal tipo celular del hígado. Así pues, es en los sinusoides donde confluyen las ramas de la arteria hepática y de la vena porta.

### 1.3 Tipos celulares

Aparte de las células parenquimales o hepatocitos, el hígado está constituido por células no parenquimales, entre las que cabe destacar a las células endoteliales del sinusoides, las células de Kupffer y las células estrelladas (Fig.3). Además de estas, existe una pequeña población de células madre.

**Fig.3. Tipos celulares presentes en el hígado.**

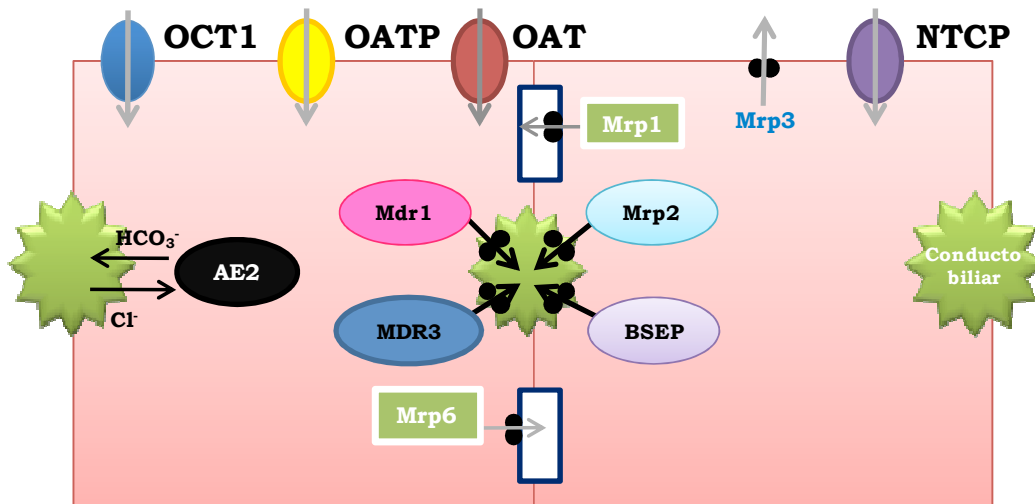


### 1.3.1 Células parenquimales

#### HEPATOCITOS

Los hepatocitos representan el 60-70% de las células hepáticas y, dado su gran tamaño, ocupan el 80% del volumen del parénquima y el 90% de la masa celular del hígado (Alpini et al., 1994). Poseen una morfología poliédrica con núcleos redondos, centrales o excéntricos, conteniendo uno o más nucléolos, y numerosos orgánulos, especialmente retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas y mitocondrias. El diámetro celular varía entre 15-30µm, con un valor medio de 25µm. Están dispuestos en cordones, formando en los organismos adultos una fila simple de células separadas del sinusoides vascular por el espacio de Disse (Fig.3). Presentan una clara polarización en la membrana plasmática, diferenciándose distintas regiones con especificidad propia, tanto morfológica como funcional (Fig.4) (Meier, 1988).

**Fig.4. Polarización de la membrana plasmática de los hepatocitos.**



- **Membrana basal o sinusoidal.** Pertenece al dominio de superficie basolateral del hepatocito. Se encuentra orientada al polo sanguíneo, es decir, al espacio perisinusoidal o espacio de Disse. Presenta un gran

número de microvellosidades para aumentar la superficie de contacto con dicho espacio, el cual constituye un microambiente intersticial donde se realizan los intercambios celulares de oxígeno y de productos del metabolismo hepático. El menor contenido de colesterol le confiere a esta zona de la membrana plasmática una mayor fluidez, lo cual resulta imprescindible para la actividad de los sistemas transportadores con función de incorporación o captación. La diversidad de estos sistemas transportadores depende de las características físico-químicas de la molécula a transportar. Entre ellos, se encuentra la proteína cotransportadora de ácido taurocólico dependiente de sodio (NTCP), el polipéptido transportador de aniones orgánicos independiente de sodio (OATPs), el transportador de aniones orgánicos independiente de sodio (OATs) y el transportador de cationes orgánicos poliespecíficos (OCT1) (Fig.4) (Lecureur et al., 2000; Monte et al., 2009).

- **Membrana lateral.** Es una región especializada en la comunicación funcional entre los hepatocitos adyacentes y en la adhesión intercelular, constituyendo una barrera electrolítica canaliculo-sinusoidal (Meier, 1988). Al igual que la membrana basal o sinusoidal, la membrana lateral pertenece al dominio de superficie basolateral del hepatocito (Fig.4).

- **Membrana canalicular o apical.** Es una invaginación del 3% de la superficie de la membrana celular del hepatocito, en forma de medio cilindro. Al unirse a la formación equivalente del hepatocito adyacente forma el canaliculo biliar por donde será secretada la bilis. El elevado contenido en colesterol de este dominio explica su bajo grado de fluidez. En esta región se localizan los transportadores con función de excreción, expresados principalmente en la membrana lateral y canalicular del hepatocito, permitiendo la eliminación de compuestos hacia el sinusoide o canaliculo biliar, respectivamente. En la membrana lateral se encuentra la familia de proteínas asociadas a la resistencia a multidroga (MRPs), cuya principal función es bombear drogas metabolizadas por los sistemas de detoxificación hepáticos, desde los

hepatocitos hacia la sangre circulante. Mientras que las proteínas MRP1 y MRP6 se localizan en la membrana lateral, MRP2 y MRP3 se encuentran en la membrana canalicular y en la membrana basal del hepatocito, respectivamente. Adicionalmente, en la membrana canalicular se encuentran los transportadores que pertenecen a la familia de la glicoproteína-P. Esta familia de transportadores la componen dos clases: la clase I o MDRI, formada por el transportador MDR1 ó MDR1b, y la clase III, formada por el transportador MDR3 (Lecureur et al., 2000). MDR3 es una glicoproteína que funciona como un transportador de fosfolípidos. La presencia de fosfolípidos en la bilis tiene función citoprotectora frente a la lesión de los hepatocitos por los ácidos biliares (Ciocca and Alvarez, 2009). Además de estos, en la membrana canalicular se localiza otro miembro de la familia de la glicoproteína-P, conocido como bomba exportadora de sales biliares (BSEP) dependiente de ATP, capaz de transportar el ácido biliar taurocolato hacia el canalículo biliar, en contra del gradiente de concentración (Gerloff et al., 1999). Por último se localiza la isoforma 2 del intercambiador de aniones cloruro-bicarbonato (AE2) responsable de la secreción de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) en la bilis independiente de sales biliares (Trauner and Boyer, 2003) (Fig.4).

### **1.3.2 Células no parenquimales**

#### **CÉLULAS ENDOTELIALES**

Las células endoteliales son las células que se encuentran tapizando la pared del sinusoides hepático. Carecen de membrana basal y poseen en su membrana unos poros o fenestraciones que permiten el intercambio de solutos y partículas desde el espacio intravascular al espacio de Disse y los hepatocitos, y viceversa (Fig. 3) (Malarkey et al., 2005).

#### **CÉLULAS DE KUPFFER**

Son los macrófagos residentes en el hígado, pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear, y representan el 15% de todas las

células hepáticas. Su función es fagocitar las partículas exógenas extrañas y restos celulares procedentes de la vena porta y de la circulación arterial, que pudieran alterar la homeostasis del propio organismo. Actúan como células presentadoras de antígenos, liberando una gran cantidad de mediadores inflamatorios tras su activación, los cuales ejercen una función quimiotáctica y de señalización sobre los hepatocitos y el resto de células no parenquimales (Malarkey et al., 2005). Se localizan en la cara interna de los sinusoides hepáticos y emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse (Fig.3).

### **CÉLULAS ESTRELLADAS**

También conocidas como células de Ito o células almacenadoras de grasa. Se encuentran localizadas en el espacio de Disse, en contacto directo con las células endoteliales del sinusoides y los hepatocitos (Fig.3). Su principal función en estado de reposo es el almacenamiento de vitamina A y otros retinoides en forma de gotas lipídicas. En condiciones patológicas, las células estrelladas se activan a miofibroblastos, aumentando la expresión de actina y colágeno de tipo I y participando en el desarrollo de fibrosis hepática. Posteriormente, proliferan y migran al lugar de la lesión, acumulándose en la matriz extracelular y provocando la cicatrización (Blomhoff and Wake, 1991; Friedman, 2000).

### **CÉLULAS MADRE**

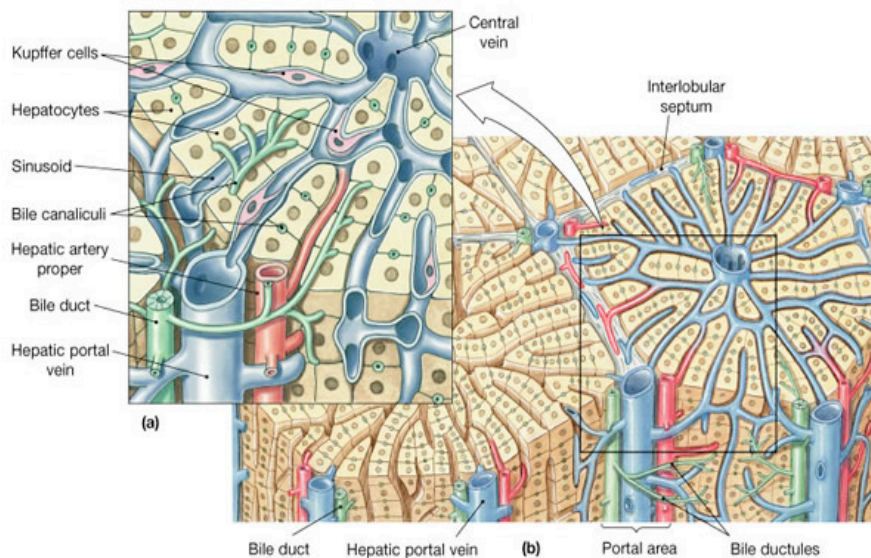
Adicionalmente, en el hígado existe una población de células indiferenciadas denominadas células ovas o células madre, con capacidad de diferenciarse hasta hepatocitos y células del conducto biliar. De este modo, participan en la regeneración hepática después de un daño. Estas células tienen un aspecto morfológico similar al de las células ductulares y expresan citoqueratinas (característica propia de su origen biliar), marcadores propios de hepatocitos como la  $\alpha$ -fetoproteína, y marcadores hematopoyéticos (Oh et al., 2002). Se

encuentran localizadas en el denominado conducto de Hering, formado por cada una de las derivaciones de los conductos biliares.

## 1.4 Estructura histológica

El hígado se encuentra recubierto por una capa de células mesoteliales. Por debajo, se encuentra una delgada cápsula de tejido conectivo (cápsula de Glisson) que se extiende a nivel del hilio, ramificándose y penetrando en el parénquima hepático. La unidad microscópica anatómica y funcional del hígado está representada por unas formaciones diminutas, denominadas lobulillos hepáticos, que poseen forma hexagonal y se encuentran separados entre sí por tejido conectivo. Dichos lobulillos están constituidos por filas de hepatocitos, dispuestos de forma radial alrededor de la vena central o centrolobulillar, que ésta rodeada por canalículos biliares hacia los que se vierte la bilis secretada por los hepatocitos. En la periferia de los lobulillos hepáticos, localizada en los espacios porta, se encuentra la triada hepática constituida por un conducto biliar, una rama de la vena porta y otra de la arteria hepática. Desde los espacios porta, las ramas terminales de la vena porta y de la arteria hepática envían la sangre hacia los sinusoides y, desde estos, hacia las venas centrolobulillares gracias al gradiente tensional existente entre ambas regiones (Fig.5).

**Fig.5. Estructura del hígado.** Lobulillos hepáticos (b) y porción de un lobulillo (a).



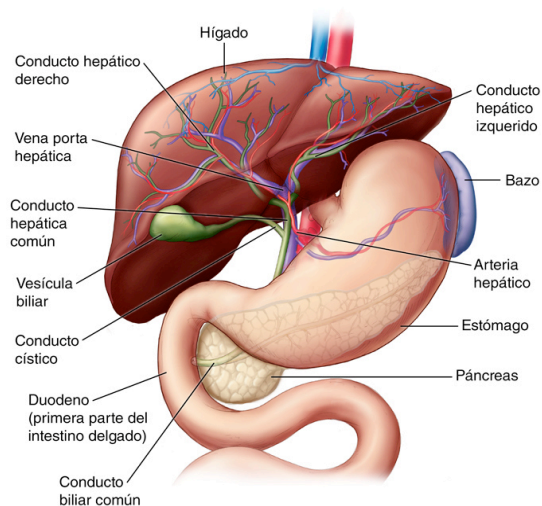
El concepto de lobulillo hepático se complementa con el de acino hepático. Cada acino está compuesto por un espacio porta (con una rama portal y otra arterial que aportan sangre a los sinusoides de distintos lobulillos) y las venas centrolobulillares dispuestas en la periferia. La diferencia principal entre ambas estructuras, el lobulillo y el acino hepáticos, radica en la dirección del flujo sanguíneo en relación con el centro de la unidad estructural: mientras que en el lobulillo hepático la vena centrolobulillar se localiza en el centro de la estructura, en el acino es la tríada hepática la que constituye el centro estructural.

## 1.5 Anatomía de la vía biliar

El árbol o vía biliar lo constituyen un conjunto de ductos intra- y extrahepáticos por los que discurre la bilis secretada por los hepatocitos (Fig.6). Está compuesta por los canaliculos biliares, formados por la membrana apical de los hepatocitos, que van confluyendo en sucesivos canales de mayor calibre hasta llegar a los conductos hepáticos derecho e izquierdo que, finalmente, confluyen en el conducto hepático común.

Este último se une al conducto cístico, procedente de la vesícula biliar, para formar el colédoco, el cual transporta la bilis hasta la porción descendente del duodeno, la primera porción del intestino delgado. Así pues, la correcta secreción de la bilis depende de la funcionalidad de los sistemas de transporte presentes en los hepatocitos, así como de la integridad funcional y estructural de la vía biliar (Esteller, 2008).

**Fig.6. Estructura de la vía biliar.**





## **2. LA BILIS**

### **2.1 Composición de la bilis**

El componente mayoritario de la bilis son las sales biliares. Estas son conjugados de los ácidos biliares con los aminoácidos glicina o taurina, y constituyen la fracción dependiente del flujo biliar. El remanente, por tanto, corresponde a la fracción independiente del flujo biliar, y está constituida por agua, lípidos, proteínas (albúmina e inmunoglobulinas), glutatión, colesterol, fosfolípidos, pigmentos biliares (bilirrubina y biliverdina), nucleótidos de adenosina, hormonas esteroideas y tiroideas, glucosa e iones sodio, potasio, cloruro, calcio y bicarbonato (Chari et al., 1996; Esteller, 2008).

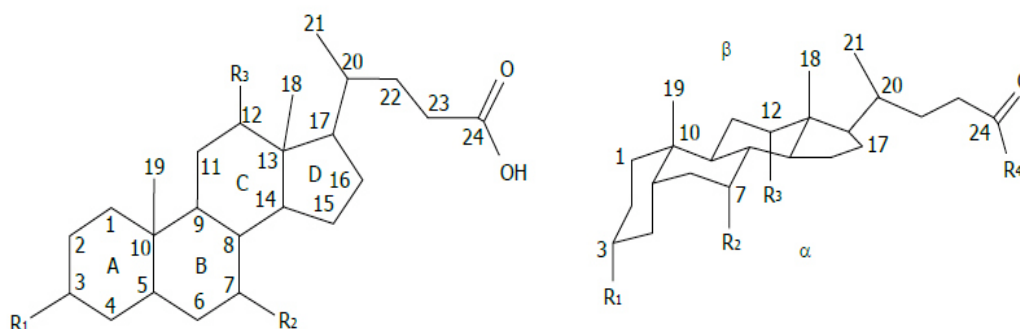
### **2.2 Ácidos biliares. Estructura química**

Los términos “ácidos biliares” y “sales biliares” suelen emplearse indistintamente en la literatura biomédica. Sin embargo, indican situaciones diferentes relacionadas con el estado de ionización de estas moléculas. Así, las sales biliares son las formas ionizadas de los ácidos biliares, y se encuentran en la bilis como sales sódicas o potásicas. Este hecho hace que las sales biliares sean más hidrosolubles que sus respectivos ácidos.

Los ácidos biliares son esteroides de 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxilados, con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y con un grupo carboxilo en la cadena lateral, que puede estar conjugado con glicina o taurina (Roger et al., 1983). El núcleo esteroide de los ácidos biliares se caracteriza por el número y la posición variable de los grupos hidroxilo y, en determinadas situaciones, por la presencia de dobles enlaces. La base del núcleo esteroide es el anillo ciclopentano-perhidrofenantreno que consta de 3 anillos de 6 átomos de carbono (A, B y C) y uno de 5 carbonos (D) (Monte et al., 2009). Una característica estructural común a todos los ácidos biliares y al colesterol es la presencia de dos grupos metilo

angulares (en C-19 y en C-18) que se encuentran en el plano que contiene las cuatro estructuras anulares (Fig.7).

**Fig.7. Estructura química de los ácidos biliares.**



En humanos adultos, el núcleo esteroide aparece curvado debido a que los anillos A y B se encuentran en configuración “cis”, disponiéndose en planos perpendiculares uno respecto al otro, cuando el hidrógeno del C-5 se dispone en posición  $\beta$ . Por ello, a estos ácidos biliares se les denomina  $5\beta$ -ABs. En ciertos defectos congénitos del metabolismo de los ácidos biliares, en fetos humanos sanos y en algunas patologías hepáticas aparecen ácidos biliares en los que los anillos A y B se encuentran en el mismo plano, es decir, con el hidrógeno del C-5 en posición  $\alpha$ ; a estos se les llama  $5\alpha$ -ABs, ABs planos o  $5\alpha$ -ABs (El-Mir et al., 2001).

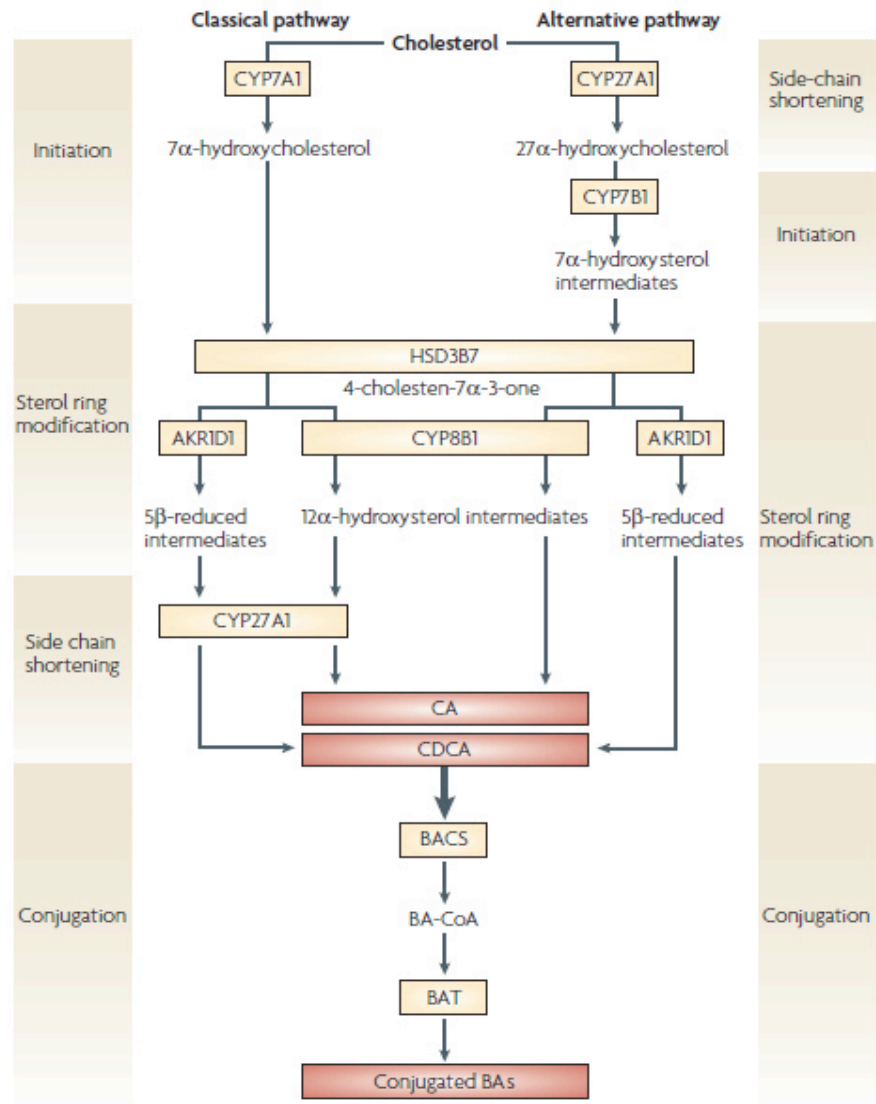
### 2.3 Biosíntesis de los ácidos biliares

En el duodeno, la bilis se mezcla con las grasas de los alimentos y participa como emulsionante de los ácidos grasos para su posterior absorción. Además de esta función, la bilis actúa como una secreción de excreción, eliminando productos de desecho y compuestos como la bilirrubina, el colesterol y hormonas (Hofmann and Eckmann, 2006). Así, una vez que el hígado ha descompuesto las sustancias nocivas, los subproductos se excretan en la bilis o la sangre, de forma que los subproductos biliares ingresan en el intestino y, finalmente, salen del

cuerpo a través de las heces. Por su parte, los subproductos sanguíneos se filtran en los riñones y salen del cuerpo en mediante la orina.

Los ácidos biliares primarios son detergentes fisiológicos sintetizados por los hepatocitos como resultado del metabolismo del colesterol. El proceso de síntesis de ácidos biliares está catalizado por diversas enzimas, entre las que destacan la colesterol 7 $\alpha$ -colesterol hidroxilasa (CYP7A1), la esterol 12 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP8B1), la esterol 27 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27A1) y la oxiesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7B1), como enzimas reguladoras clave (Monte et al., 2009). La reacción ocurre por adición de grupos hidroxilo, la oxidación de la cadena lateral y el acortamiento de la molécula de colesterol. La hidroxilación ocurre siempre en un lado de la cadena, por lo que las sales biliares resultantes son moléculas anfipáticas, siendo más hidrofílicas que el colesterol (Maillette de Buy Wenniger and Beuers, 2010). El resultado es la formación de compuestos ionizados e hidrosolubles, fácilmente excretables y de gran utilidad en los procesos digestivos. La estructura de los ácidos biliares les confiere propiedades detergentes y les permite asociarse entre sí, formando agregados moleculares o micelas a partir de una concentración determinada denominada “concentración micelar crítica”. Del mismo modo, los ácidos biliares pueden formar micelas mixtas en presencia de otras moléculas como fosfolípidos (fosfatidilcolina), colesterol, monoglicéridos y ácidos grasos (Hofmann and Hagey, 2008). En condiciones fisiológicas, la formación de las micelas ocurre en la vesícula biliar y favorece la solubilización y la excreción del colesterol, así como la emulsión de las grasas y de las vitaminas liposolubles procedentes de la dieta en el tracto intestinal, promoviendo su absorción (Coleman, 1987). En humanos, la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol produce mayoritariamente los ácidos biliares primarios denominados ácido cólico (CA) (3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -colanoico) y ácido quenodesoxicólico (CDCA) (3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico), y ocurre a través de dos vías: la vía clásica y la vía alternativa (Fig.8) (Thomas et al., 2008).

**Fig.8. Vías de síntesis de los ácidos biliares.** Esquema representativo de la vía clásica v alternativa de síntesis de ácidos billares (Thomas et al.. 2008).



- Vía clásica de síntesis de ácidos biliares.** Se conoce también como la vía neutra, ya que sus intermediarios metabólicos son esteroides neutros. Se encuentra presente exclusivamente en el hígado y es responsable de la síntesis del 75% del conjunto de ácidos biliares. A través de esta vía se sintetizan los ácidos biliares primarios mayoritarios, CA y CDCA, implicando diferentes enzimas localizadas en el citosol, microsomas, mitocondrias y peroxisomas. La enzima microsomal hepática CYP7A1 cataliza la primera reacción de esta vía clásica para convertir el colesterol en 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol (Fig. 8). A

partir de aquí, se suceden distintas reacciones en las que intervienen las enzimas microsomales 3 $\beta$ -hidroxi- $\Delta$ 5-C27-esteroideisomerasa (HSD3B7) y CYP8B1, y las enzimas citosólicas  $\Delta$ 4-3-oxoesteroide-5 $\beta$ -reductasa (AKR1D1) y 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (AKR1C4), encargadas estas últimas de la síntesis de los precursores del CDCA y CA, respectivamente. La CYP27A1 oxida la cadena lateral de ambos precursores (posición C-27), los cuales son posteriormente oxidados hasta ácidos carboxílicos. Los productos, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-ácido-5 $\beta$ -colestanoico (DHCA) y 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxi-ácido-5 $\beta$ -colestanoico (THC), respectivamente, son activados a sus ésteres de coenzima A de ácidos biliares por mediación de la coenzima A sintetasa (BACS) o la acil-coenzima A sintetasa de cadena larga (VLCS), localizadas en el RE. Los productos resultantes son transportados hasta los peroxisomas, donde se produce el acortamiento de la cadena lateral por  $\beta$ -oxidación mediante la participación de cuatro enzimas peroxisomales. El último paso de la vía clásica implica la conjugación del ácido carboxílico de la cadena lateral con los aminoácidos glicina o taurina, en un proceso catalizado por la enzima ácido-amino-N-acetiltransferasa (BAAT), localizada tanto en los peroxisomas como en el citosol. Esto implica que, mientras que la BAAT peroxisomal podría ser responsable de la conjugación de los ácidos biliares recién formados, la BAAT citosólica podría estar involucrada en la reconjugación de los ácidos biliares primarios y secundarios, los cuales han sido desconjugados previamente por las bacterias intestinales. No obstante, estudios recientes apoyan la noción de que BAAT es principalmente una enzima peroxisomal, presente en el citosol en cantidades indetectables. De acuerdo a esta teoría, una vez desconjugados en el intestino, los ácidos biliares tendrían que volver al hígado y ser transportados al peroxisoma para poder ser nuevamente conjugados (Monte et al., 2009).

- **Vía alternativa de síntesis de ácidos biliares.** En ella, la oxidación de la cadena lateral de la molécula de colesterol precede a la modificación del anillo esteroide, formándose metabolitos intermedios

ácidos. Por este motivo, es también conocida como la vía ácida. La primera etapa de la ruta implica a las enzimas microsomales CYP27A1 y CYP7B1, las cuales oxidan el colesterol hasta 27-hidroxicolesterol y 7 $\alpha$ ,27-dihidroxicolesterol, respectivamente (Fig. 8). A partir de este punto, la vía se desarrolla de la misma forma que la vía clásica. El principal ácido biliar formado a través de la ruta alternativa es el CDCA. En humanos, la vía alternativa contribuye en un 10% a la restitución de la pérdida diaria de ácidos biliares, en condiciones normales. No obstante, puede convertirse en la principal ruta biosintética en diversas patologías hepáticas (Monte et al., 2009).

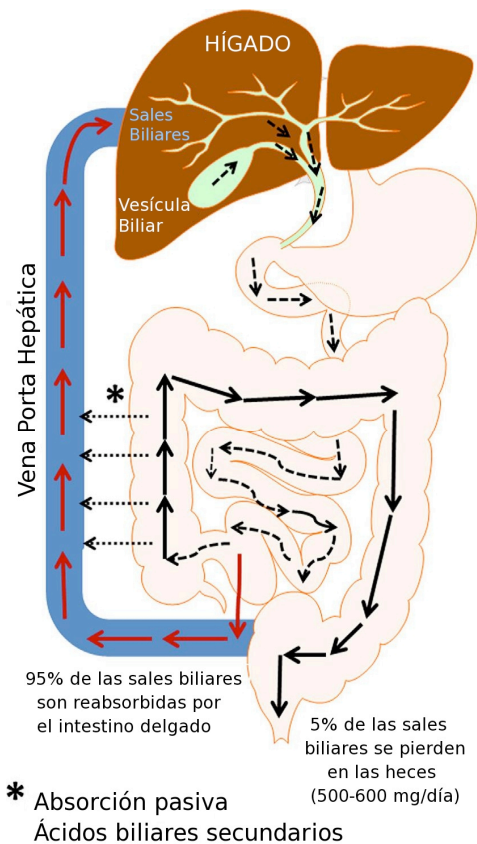
## **2.4 Biotransformación y circulación enterohepática de los ácidos biliares**

Antes de ser excretados por los hepatocitos y secretados hacia la bilis, los ácidos biliares CA y CDCA se conjugan con los aminoácidos glicina y taurina, generando ácido glicocólico (GCA) ó taurocólico (TCA), y ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA) ó tauroquenodesoxicólico (TCDCA), respectivamente. En condiciones fisiológicas, la conjugación de las sales biliares incrementa su solubilidad en agua, siendo en humanos más abundantes las formas conjugadas con glicina que las conjugadas con el aminoácido taurina (Hofmann, 1999).

Pese a que su secreción es continua, la bilis se almacena en la vesícula biliar durante los periodos de ayuno. Tras la ingesta, la bilis es liberada al duodeno mediante la participación de la hormona colecistocinina (CKK; producida por el intestino delgado), la cual participa en la contracción de la vesícula biliar y favorece su vaciado. Finalizado el proceso de emulsión de las grasas de los alimentos, las sales biliares sufren un proceso de reciclaje, entrando en la circulación enterohepática y volviendo nuevamente al hígado. De esta forma, el 95% de los ácidos biliares son recuperados por transporte activo en el intestino, principalmente a nivel del íleon (Fig.9).

Una vez han alcanzado el tránsito intestinal, la absorción activa de los ácidos biliares por parte de los enterocitos ocurre a través del transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT), localizado en el borde en cepillo de la membrana de la célula epitelial intestinal. Dicho transportador es capaz de transportar dos iones sodio junto con una molécula de ácido biliar. A continuación, los ácidos biliares se ven sometidos a fenómenos de desconjugación, dehidroxilación y oxidación, llevados a cabo por bacterias de la flora intestinal. Durante el proceso de desconjugación, las hidrolasas de los ácidos biliares actúan sobre la cadena lateral, liberándolos de los aminoácidos glicina o taurina. A continuación, los ácidos biliares son sometidos a un fenómeno de dehidroxilación en C-7. Para ello, las dehidratasas bacterianas actúan sobre el grupo hidroxilo, formando los 7-desoxi ácidos biliares. En consecuencia, se originan los ácidos biliares secundarios como el ácido desoxicólico o DCA (3 $\alpha$ , 12 $\alpha$  dihidroxi-ácido 5 $\beta$ -colanoico) y el ácido litocólico o LCA (3 $\alpha$ -hidroxi-ácido 5 $\beta$  colanoico), procedentes del CA y del CDCA, respectivamente. Ambas moléculas son reabsorbidas parcialmente en el colon y transportadas nuevamente a los hepatocitos. La oxidación y la epimerización del grupo 3-, 7- ó 12-hidroxilo de los ácidos biliares es un proceso que también ocurre a nivel intestinal, propiciada por las enzimas hidroxisteroide deshidrogenasas (HSDHs) presentes en las bacterias intestinales. Este proceso de

**Fig.9. Circulación enterohepática de los ácidos biliares.**

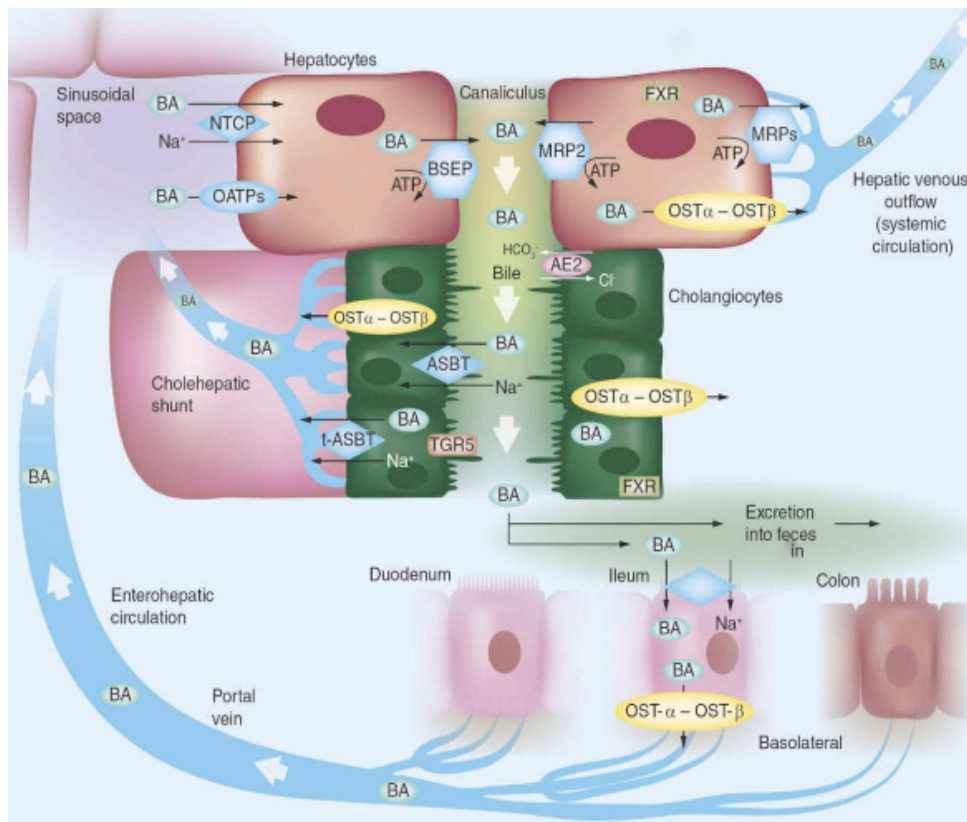


epimerización implica un cambio reversible en la configuración desde  $\alpha$  hasta  $\beta$ , o viceversa. Así, la epimerización de CDCA resulta en la generación de UDCA (3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihidroxi-ácido 5 $\beta$ -colanoico), presente en el conjunto de ácidos biliares humanos (Monte et al., 2009). Por tanto, el UDCA presenta una estructura química idéntica al CDCA, excepto por el grupo hidroxilo en C-7 que se encuentra en configuración  $\beta$ .

Tras finalizar todos los procesos de biotransformación en el intestino, los ácidos biliares salen del lumen intestinal a través del transportador de solutos orgánicos  $\alpha$  y  $\beta$  (OST $\alpha$  Y OST $\beta$ ), alcanzando el hígado vía sangre portal (Fig. 9), unidos a moléculas de albúmina. En menor medida, los ácidos biliares también pueden retornar al hígado a través de la arteria hepática. Una vez en el hígado, la absorción de la gran mayoría de ácidos biliares es dependiente de sodio y se realiza a través del transportador NTCP. No obstante, la captación sinusoidal independiente de sodio también ocurre, propiciada por los miembros de la familia OATP, principalmente OATP1B1 y OATP1B3 (Fig. 10). Una vez en el hepatocito, el DCA se conjuga con el aminoácido glicina o taurina para circular nuevamente junto con los ácidos biliares primarios. Del mismo modo, el LCA se conjuga con glicina o taurina y, adicionalmente, se sulfata en posición C-3 para poder ser excretado en la bilis. En contraposición al proceso que sufren los ácidos biliares primarios y el DCA, el LCA no es absorbido por el intestino delgado de forma eficiente, siendo eliminado por el organismo vía fecal. Así, el LCA no contribuye más del 5% al total de ácidos biliares. Finalmente, los ácidos biliares son secretados de nuevo en la bilis a través de la bomba exportadora BSEP, dependiente de ATP y localizada en el canalículo biliar. En el caso particular de los ácidos biliares conjugados con sulfato, estos son transportados a través de otras bombas localizadas en la membrana canalicular del hepatocito, como son MRP2 y BCRP (Fig.10).



**Fig.10. Sistemas de transporte hepatobiliar.** Sistemas hepáticos y extrahepáticos implicados en el transporte de ácidos biliares (BA) (Ali et al., 2016).



Las sales biliares también pueden ser secretadas al conducto biliar a través de las células epiteliales del conducto biliar o colangiocitos, aunque este mecanismo es menos frecuente bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, durante la colestasis puede convertirse en una importante ruta alternativa de secreción de las sales biliares. Así, la membrana de los colangiocitos presentan sistemas de transporte con función secretora y también de absorción de sales biliares. Como sistema de absorción se encuentra el transportador dependiente de sodio ASBT, localizado en la membrana basolateral del colangiocito. Por el contrario la secreción de la sales biliares hacia la sangre circulante ocurre a través de la bomba MRP3 y miembros de la familia de los transportadores OSTα y β (Trauner and Boyer, 2003).

En la tabla 1 se indican los niveles fisiológicos de los ácidos biliares presentes en el suero y en la bilis (Woolbright et al., 2015).

Además de las sales biliares, otros constituyentes orgánicos de la bilis, como el colesterol y los fosfolípidos, son reabsorbidos eficientemente por el hígado a través de la circulación enterohepática (Trauner and Boyer, 2003). La eficacia de la circulación enterohepática asegura que, de los 3-4 gr del reservorio de sales biliares en el humano adulto, el cual circula entre 6 y 10 veces cada 24 h a través de la circulación enterohepática, únicamente se pierden 0,5 gr a través de la excreción fecal. Esta pérdida viene compensada con la síntesis *de novo* de sales biliares en el hígado (Meier and Stieger, 2002; Monte et al., 2009; Thomas et al., 2008).

**Tabla 1. Niveles fisiológicos de los ácidos biliares en bilis y suero. UI (pacientes sin daño hepático)** (Woolbright et al., 2015).

Bile acid	Bile	Serum
	UI patient ( $\mu\text{M}$ )	UI patient ( $\mu\text{M}$ )
LCA	<10	<0.1
UDCA	67 $\pm$ 20	<0.1
CDCA	<10	0.9 $\pm$ 0.3
DCA	116 $\pm$ 100	1.0 $\pm$ 0.4
CA	<10	<0.1
TCA	2403 $\pm$ 223	0.4 $\pm$ 0.1
GCDC	4325 $\pm$ 661	2.8 $\pm$ 0.4
TCDC	1067 $\pm$ 217	0.4 $\pm$ 0.1
GCA	3030 $\pm$ 600	0.4 $\pm$ 0.1
GDCA	3643 $\pm$ 742	0.8 $\pm$ 0.3
TDCA	712 $\pm$ 202	0.3 $\pm$ 0.1

## 2.5 Papel fisiológico de los ácidos biliares

Además del papel de los ácidos biliares en la absorción intestinal, el transporte de nutrientes, grasas y vitaminas, y la eliminación de productos de deshecho, los efectos fisiológicos de los ácidos biliares son muy diversos. Entre ellos, cabe destacar:

- **Contracción canalicular.** En el hígado, los ácidos biliares estimulan la contracción canalicular, colaborando en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar.

- **Señalización celular.** Los ácidos biliares actúan como moléculas de señalización celular mediante la activación de receptores nucleares o de membrana. Tales receptores participan en la síntesis, excreción y transporte de los ácidos biliares, así como en su detoxificación y en la de drogas y de compuestos xenobióticos (Chiang, 2009). Así, los ácidos biliares son capaces de activar a receptores tales como el receptor nuclear FXR (Houten, 2006) o el receptor de membrana de ácidos biliares acoplados a proteína G (TGR5) (Kawamata et al., 2003), y poner en marcha la cascada de activación de las proteínas quinasas activadoras de mitógeno (MAPK) (Qiao et al., 2003).

- **Absorción intestinal.** Los ácidos biliares facilitan la absorción intestinal de calcio e hierro.

- **Secreción enzimática.** Los ácidos biliares modulan la secreción de enzimas pancreáticas y la liberación de CKK.

- **Actividad antimicrobiana.** Los ácidos biliares actúan como agentes antimicrobianos.

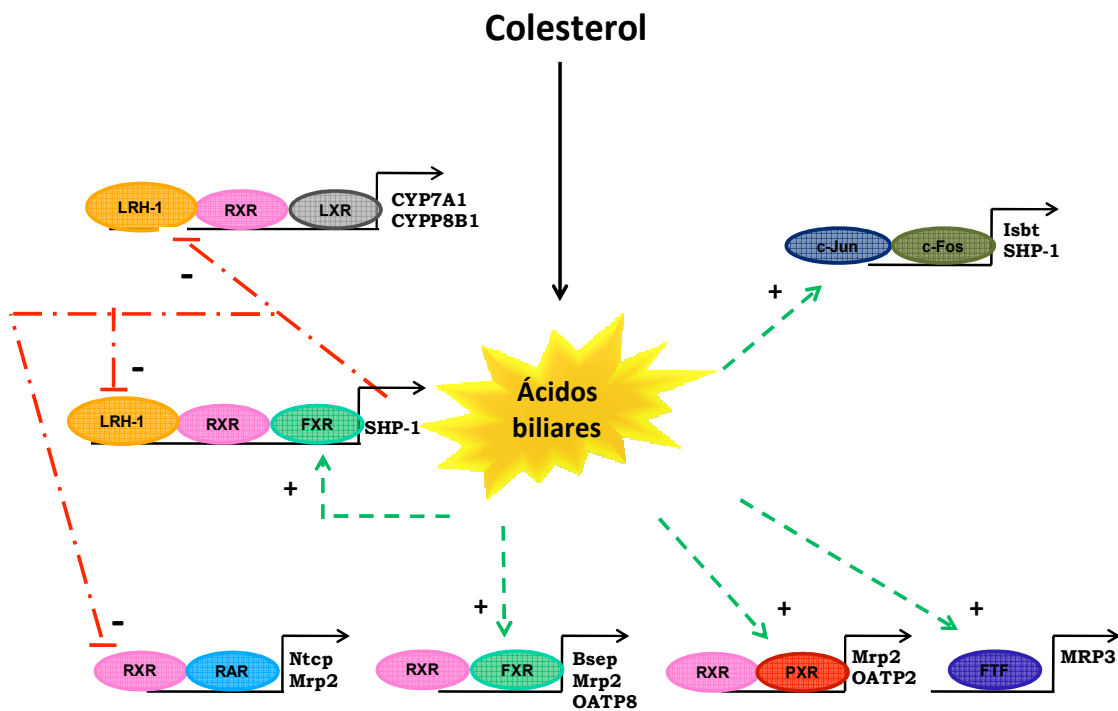
## **2.6 Regulación de la síntesis de los ácidos biliares**

La concentración de los ácidos biliares en la sangre portal es el factor que regula la síntesis y la secreción biliar. Cuando la concentración de ácidos biliares es alta, se inhibe la síntesis de los mismos, favoreciéndose la secreción biliar (efecto colerético), y viceversa (Hofmann, 1999; Perez and Briz, 2009). Así pues, los ácidos biliares ejercen una regulación de retroalimentación negativa sobre su propia síntesis, inhibiendo la expresión y actividad de las enzimas CYP7A1, CYP8B1 y CYP27A1. Este efecto está mediado principalmente por el receptor nuclear de ácidos biliares FXR (receptor X farnesoide). Tras su activación por los ácidos biliares, FXR induce la expresión del represor transcripcional SHP-1, que interacciona negativamente con el factor de

transcripción (FT) LRH-1 (homólogo del receptor hepático 1), uniéndose a los elementos de respuesta de los ácidos biliares (BAREs) localizados en la región promotora de los genes CYP7A1 y CYP8B1, inhibiendo su expresión. Como consecuencia, la síntesis de los ácidos biliares queda reprimida. Del mismo modo, los ácidos biliares pueden inhibir la síntesis de otros genes dependientes de BAREs, como NTCP y MRP2, a través de la misma vía. Por otro lado, la activación de FXR estimula la transcripción génica de BSEP, MRP2 y OATP8.

Otro mecanismo de regulación de la síntesis de sales biliares ocurre a través del receptor nuclear pregnano X (PXR), activándose en presencia de sales biliares e induciendo la transcripción de los genes OATP2 y MRP2, o a través del FT de la  $\alpha$ -fetoproteína (FTF), que actúa regulando la expresión génica de MRP3 (Fig.11) (Trauner and Boyer, 2003).

**Fig.11. Regulación de la síntesis de ácidos biliares** (Trauner and Boyer, 2003).



Además de los mencionados, han sido descritos otros mecanismos de regulación dependientes de FXR pero independientes de SHP-1, implicados en la disminución de la expresión de CYP7A1, donde se muestran evidencias de la importancia de la vía FGF-19/FGFR4 en el control de la regulación negativa de la síntesis de ácidos biliares. Asimismo, se ha visto que ciertas hormonas y componentes exógenos pueden afectar a la síntesis de ácidos biliares. Entre ellos, cabe destacar a la insulina, las hormonas tiroideas, el fenobarbital o la rifampicina (Thomas et al., 2008).

## **2.7 Toxicidad de las sales biliares**

La citotoxicidad de las sales biliares se atribuye a su efecto detergente, el cual se relaciona con el balance hidrofóbico-hidrofílico de las mismas. Así, la eficacia de los ácidos biliares para solubilizar los componentes lipídicos de las membranas celulares se ve incrementada conforme aumenta el grado de hidrofobicidad de los mismos. La acción detergente de los ácidos biliares es responsable de la solubilización y la alteración de la integridad de la membrana basolateral y canalicular de los hepatocitos, actuando sobre los componentes lipídicos de las mismas y, como consecuencia, provocando la lisis celular (Perez and Briz, 2009).

Las sales biliares con mayor efecto detergente son las no conjugadas y las conjugadas con el aminoácido glicina. En contraposición, las sales biliares con menor efecto detergente son las conjugadas con el aminoácido taurina y las sulfatadas. Dentro de cada clase, las sales biliares se pueden clasificar en base a su poder detergente. Ordenadas de manera decreciente, las sales biliares con mayor poder detergente, es decir, con mayor grado de hidrofobicidad, serían: LCA > DCA > CDCA > CA > UDCA (Lecureur et al., 2000). Además, el DCA y el CDCA poseen una concentración micelar crítica menor que el CA, lo que las hace más citotóxicas a cualquier concentración. El mediador del daño hepático inducido por CDCA es su

metabolito intestinal LCA. Sin embargo, la sulfatación de esta molécula en el hepatocito aumenta su solubilidad en agua, disminuyendo así su absorción intestinal, su acumulación en la circulación enterohepática y, por tanto, su potencial hepatotóxico (Attili et al., 1986).

La hidrofobicidad, o lo que es lo mismo, la toxicidad de los ácidos biliares depende del número, posición y orientación de los grupos hidroxilo, así como de la amidación en el C-24. Así, la administración *in vitro* de bajas concentraciones de la sal biliar monohidroxilada TLC induce una alteración estructural y funcional en la membrana de los hepatocitos y, como consecuencia, daño celular. Por el contrario, la misma concentración de las sales biliares dihidroxiladas CDCA y DCA induce una leve lisis celular pero no se relaciona con alguna otra alteración específica (Scholmerich et al., 1984). Del mismo modo, el enriquecimiento de la bilis con sales biliares altamente hidrofílicas como el UDCA está raramente asociado con el daño hepático. En cambio, la administración de sales biliares más hidrofóbicas se asocia con una mayor toxicidad hepática (Attili et al., 1986).

### **3. COLESTASIS**

#### **3.1 Definición**

La síntesis, secreción y el proceso de reciclado de los ácidos biliares resulta fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metabólica del hígado. Alteraciones en este flujo de acontecimientos deriva en el desarrollo de la enfermedad hepática colestática. Así pues, la colestasis se caracteriza por una alteración en la formación de la bilis, que viene acompañada o es causada por un defecto de la excreción de la bilis hacia el canalículo biliar. Como consecuencia, se produce una alteración en la circulación enterohepática de los ácidos biliares, aumentando su concentración a nivel sérico y hepático (Guicciardi and Gores, 2005).

La colestasis puede considerarse crónica si persiste durante más de seis meses (Liver, 2009), clasificándose como intrahepática o extrahepática dependiendo de la naturaleza de la alteración del flujo biliar. En la colestasis intrahepática, el daño puede estar provocado por defectos funcionales localizados en cualquier punto entre el citoplasma de los hepatocitos y los conductos biliares de mediano calibre (100-400  $\mu\text{m}$ ). En la colestasis extrahepática, por el contrario, la lesión obstructiva se encuentra en los conductos biliares grandes (McIntyre, 1999). Pese a que la mayoría de las enfermedades colestáticas son exclusivamente intrahepáticas, otras como la colangitis esclerosante primaria (CEP) pueden afectar a los pequeños y grandes conductos biliares intra y extrahepáticos (Liver, 2009).

La etiología de la colestasis comprende a un grupo diverso de trastornos, con distinta epidemiología, fisiopatología, evolución y pronóstico, comprendiendo desde alteraciones moleculares causadas por variaciones genéticas o la administración de drogas, hasta cambios estructurales promovidas por el desarrollo de trastornos que incluyen la presencia de cálculos biliares, lesiones autoinmunes de la vía biliar y tumores. Las consecuencias de la colestasis pueden ser muy graves y, si no se trata, puede resultar en fibrosis, cirrosis, hipertensión portal y fallo hepático. La colestasis crónica también incrementa el riesgo de desarrollo de carcinoma hepatocelular y colangiocelular (Li and Apte, 2015). En el peor de los casos, la consecuencia última de la colestasis es la necesidad de trasplante hepático (Karlsen et al., 2014).

### **3.2 Clasificación de los desórdenes colestáticos**

Debido a la presencia de una sintomatología común a todas las enfermedades colestáticas, su clasificación puede resultar compleja en ocasiones. Entre los desórdenes colestáticos mas frecuentes, destacan:

**Cirrosis biliar primaria (CBP).** Recientemente ha sido sustituido el término “cirrosis” por el de “colangitis” para denominar a este desorden colestático, debido a que la inmensa mayoría de pacientes recién

diagnosticados no presentan cirrosis hepática, la cual se desarrolla en la etapa final de la enfermedad (Beuers et al., 2015; Shimoda and Tanaka, 2016). La CBP afecta a 1 de cada 3.000 personas, siendo más prevalente en Inglaterra y en los países escandinavos. Es la principal causa de las enfermedades colestásicas y afecta a los conductos biliares de pequeño calibre (Ludwig, 1998). Se caracteriza por la inflamación portal, necrosis del epitelio biliar y destrucción de los conductos biliares interlobulares y septales. El 90% de los pacientes, corresponden a mujeres de edades comprendidas entre los 40 y los 65 años (Kaplan, 1996). Está asociada a la presencia de anticuerpos frente al antígeno E2 de la membrana mitocondrial interna (AMA), del complejo piruvato-deshidrogenasa (CPD). Adicionalmente, la CBP se ha relacionado con el desarrollo de autoanticuerpos frente al antígeno Sp100 intranuclear, antígenos de la envoltura nuclear como el gp210, la nucleoproteína p62 y la proteína de la leucemia promielocítica PLM (Montano Loza and Angulo, 2007). Aunque la mayoría de los datos sugieren que la CBP es secundaria a una alteración de la inmunorregulación, su patogenia es incierta y no hay evidencia de que los anticuerpos antimitocondriales intervengan directamente sobre la lesión hepática. Debido a que la proteína E2 está presente también en algunas bacterias y levaduras que colonizan a menudo las vías urinarias de las mujeres, se ha postulado que una etiología infecciosa podría ser la responsable del desarrollo de CBP (Sherlock, 1999).

- **Colangitis esclerosante primaria (CEP).** Junto con la CBP, la CEP es la enfermedad hepática colestática más frecuente en la población adulta (Nguyen et al., 2014). Se trata de un síndrome colestásico crónico, de etiología desconocida, caracterizado por un proceso inflamatorio y fibroso progresivo del árbol biliar, que afecta tanto a los conductos biliares intrahepáticos como extrahepáticos (Maggs and Chapman, 2008). Suele ir asociada a una enfermedad inflamatoria intestinal, que frecuentemente es la colitis ulcerosa (Angulo and Lindor, 1999). Pese a que la CEP es poco prevalente en países del



sur de Europa, es especialmente frecuente en los países escandinavos. Se manifiesta alrededor de los 40 años y de forma predominante en varones con colestasis clínica y analítica. La enfermedad es progresiva, con una probabilidad de supervivencia libre de trasplante de 18 años en las formas asintomáticas y de 8,5 años en las formas sintomáticas (Pares, 2011). Aunque la etiopatogenia de la CEP es desconocida, se sabe que intervienen trastornos de la inmunidad, agentes tóxicos o infecciosos procedentes del intestino, daño isquémico de los conductos biliares y alteraciones de los transportadores hepatobiliares. De hecho, entre el 26-85% de los pacientes presentan anticuerpos contra el citoplasma perinuclear de neutrófilos (p-ANCA) (Reshef et al., 2002). Además, han sido postulados mecanismos patogénicos no inmunes (bacteriemia portal, virus, tóxicos o isquemia), genéticos e inmunológicos como responsables del desarrollo de CEP.

- **Colestasis intrahepática del embarazo (CIE).** Como su nombre indica, es una enfermedad hepática específica del embarazo. De incidencia variable dependiendo de la distribución geográfica, la CIE se presenta en, aproximadamente, el 1% de los embarazos. En países escandinavos como Suecia, la CIE alcanza una incidencia del 2% de los embarazos. Generalmente, la CIE aparece hacia el tercer trimestre del embarazo y viene acompañada de complicaciones fetales cuando la concentración de ácidos biliares en suero es superior a 40 $\mu$ M. Aunque la enfermedad suele resolverse tras el parto, puede estar asociada a una patología hepática subyacente cuando las complicaciones bioquímicas persisten entre las 4-6 semanas postparto (Dixon and Williamson, 2016). La etiología de la CIE es desconocida. Sin embargo, se sabe que tiene un componente genético y que, además, influyen factores hormonales y ambientales.

- **Atresia biliar.** Proceso inflamatorio de origen idiopático, definido por la falta del lumen en parte o en la totalidad del tracto biliar extrahepático, pudiendo afectar incluso a los conductos biliares intrahepáticos. Se trata de la mayor causa de colestasis en bebés y en

niños, siendo una de las indicaciones más frecuentes para el trasplante hepático en este grupo de edad. La tasa de incidencia de esta enfermedad varía de 5 a 31 por cada 100.000 nacimientos vivos, siendo mayor en Asia y en la región del Pacífico. En Europa Occidental, la incidencia es de 1/18.000 nacimientos vivos. La incidencia en niñas es ligeramente superior que en niños. Pese a su etiología desconocida, existen estudios donde el desarrollo de atresia biliar ha sido relacionado con la infección por retrovirus tipo 3 y rotavirus, acompañada o no por una susceptibilidad genética e inmunológica (Poupon et al., 2000).

- **Colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1-3 (CIFP).** Se trata de un grupo de enfermedades colestásicas causadas por un defecto genético. Pese a que la prevalencia exacta de esta enfermedad es desconocida, se estima que su incidencia varía entre 1/50.000 – 1/100.000 nacimientos. La CIFP se clasifica en dos grupos dependiendo de los mecanismos involucrados en su generación:

- Por alteraciones en el transporte canalicular de la bilis, debido a mutaciones presentes en los genes que codifican los transportadores canaliculares. Destaca la mutación de los genes ABCB11 y ABCB4, alterando la excreción canalicular de los ácidos biliares y de la fosfatidilcolina, respectivamente (Ciocca and Alvarez, 2009).

- Por un defecto en la síntesis de los ácidos biliares causado por deficiencias enzimáticas específicas. Destaca la mutación del gen ATP8B1, que codifica para una ATPasa conocida como FIC1, expresada en la membrana canalicular de los hepatocitos así como en otros epitelios. Es responsable de la translocación de aminofosfolípidos desde la cara interna hasta la externa de la membrana plasmática de los hepatocitos, a través del FIC1. La mutación en este gen se relaciona con un aumento de la sensibilidad de la membrana plasmática al efecto detergente de los ácidos biliares y a una reducción del contenido de sales biliares en la bilis (Ciocca and Alvarez, 2009; Trauner and Boyer, 2003).

Aparte de esta clasificación, existen tres tipos de síndromes de CIFP establecidos a partir de la identificación de mutaciones en distintos genes:

1. CIFP tipo I: enfermedad crónica autosómica recesiva que se presenta durante el primer año de vida y se asocia a mutaciones en el gen ATP8B1.
2. CIFP tipo II: enfermedad colestática desarrollada durante la infancia y asociada a mutaciones en el gen ABCB11, que codifica para BSEP.
3. CIFP tipo III: enfermedad autosómica recesiva asociada a un defecto en el gen ABCB4, que codifica para la bomba exportadora de fosfolípidos MDR3, localizada en la membrana canalicular (Ciocca and Alvarez, 2009; Poupon et al., 2000).

- **Colestasis intrahepática recurrente benigna (CIRB) tipo 1 y 2.**

Son desórdenes colestásicos agudos, característicos de la adolescencia y la edad adulta, que representan las formas benignas de CIFP tipo I y II. Se han descrito dos formas de CIRB: CIRB1 y CIRB2. La CIRB1 está causada por mutaciones en el gen ATP8B1 y la CIRB2 está causada por mutaciones en el gen ABCB11.

- **Síndrome de Alagille.** También conocido como displasia arteriohepática. Se trata de una enfermedad autosómica dominante que afecta al hígado, corazón, huesos, cara y ojos. La enfermedad es heredada siguiendo un patrón autosómico dominante. La prevalencia en la población es de 1/70.000 nacimientos vivos. Se caracteriza por la hipoplasia de vías biliares intrahepáticas y se manifiesta como una colestasis intrahepática crónica iniciada en el periodo neonatal. Además, se asocia con anomalías cardíacas y oculares y defectos en los arcos vertebrales. La severidad de la enfermedad depende principalmente del grado de afección hepática y cardíaca. La etiología de esta enfermedad, en el 97% de los casos, se debe a mutaciones en el gen JAG1 (o CD339), el cual participa en la vía de señalización Notch. El 3% de los casos restantes se deben a mutaciones en el gen NOTCH2. Junto con la atresia biliar primaria, es muy frecuente en la población

pediátrica (Nguyen et al., 2014). Los pacientes afectados suelen presentar prurito y colestasis durante la infancia, asociado frecuentemente al desarrollo de cirrosis y disfunción hepática (van der Woerd et al., 2015).

- **Fibrosis quística asociada al daño hepático.** Es una enfermedad autosómica recesiva asociada a la obstrucción de los conductos hepáticos intrahepáticos. Afecta preferentemente a la población de origen caucásico, siendo su incidencia de 1/3.000 a 1/8.000 nacidos vivos. La falta de un regulador transmembrana en la región apical de las células del conducto biliar es la responsable de la presencia de alteraciones en el drenaje biliar, favoreciendo el desarrollo de colestasis y de cirrosis biliar multinodular (Colombo et al., 1996).

- **Colestasis inducida por drogas.** La exposición continua a drogas y a compuestos xenobióticos es responsable del desarrollo de reacciones adversas y severas en el hígado. Así, el daño hepático inducido por drogas puede clasificarse como colestasis inducida por drogas, hepatitis inducida por drogas o lesión hepática mixta. Mientras que la colestasis inducida por drogas en ausencia de hepatitis es una enfermedad transitoria y menos severa, el daño hepático irreversible inducido por drogas puede requerir de trasplante hepático. La disfunción mitocondrial y la inhibición del transportador BSEP se consideran pasos críticos en el desarrollo patogénico de colestasis inducida por drogas. Además, se ha visto que los ácidos biliares juegan un importante papel al inducir la expresión de genes relacionados con la inflamación (Schadt et al., 2016). Su incidencia global varía entre 1 y 15 cada 100.000 personas/año, y se asocia con el 11-50% de los casos de fallo hepático agudo. Se han descrito más de 900 compuestos relacionados con el desarrollo de lesión hepática. Los antibióticos son responsables del 27-46% de los casos de colestasis inducida por drogas, seguidos de medicamentos para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, antiinflamatorios, analgésicos y productos herbales (Leise et al., 2014). Además de estos, encontramos productos

homeopáticos, suplementos dietéticos y toxinas, utilizados o no en dosis terapéuticas (Lopez, 2014).

**Colestasis inducida por nutrición parenteral.** Es una enfermedad común en bebés prematuros y pacientes adultos que requieren un largo plazo de reposo intestinal. Entre los mecanismos postulados que han sido relacionados con esta patología cabe destacar el aumento de la formación de ácidos biliares tóxicos, la translocación bacteriana y la composición de la fórmula de la nutrición parenteral (Angulo, 2002).

### **3.3 Mecanismo molecular de citotoxicidad hepática mediado por los ácidos biliares**

Aunque los mecanismos de daño hepático asociados a la colestasis son complejos, pudiendo participar factores inmunológicos, genéticos o tóxicos, también son numerosas las evidencias clínicas y experimentales que han atribuido a los ácidos biliares un papel clave durante el desarrollo patogénico de la enfermedad hepática colestática (Serviddio et al., 2004).

Como se ha adelantado en el apartado 2.7, la citotoxicidad de los ácidos biliares se ha atribuido a sus propiedades detergentes, siendo los ácidos biliares hidrofóbicos más tóxicos que los hidrofílicos (Attili et al., 1986). No obstante, existen numerosos estudios donde la citotoxicidad de los ácidos biliares no siempre correlaciona con el grado de hidrofobicidad (Carubbi et al., 2002). De hecho, pese a que la concentración sérica de ácidos biliares en pacientes colestásicos es mucho menor que la requerida para desarrollar su acción detergente, es suficiente para activar la vía de muerte celular (Malhi et al., 2006). El empleo de concentraciones dentro del rango milimolar, similares a las alcanzadas en suero durante la colestasis, se ha relacionado con el desarrollo de daño hepático a través de un mecanismo no asociado a la capacidad detergente de los ácidos biliares. Estos mecanismos incluyen la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la inducción de la

apoptosis hepatocelular, siendo éste último un fenómeno bioquímico clave durante la enfermedad hepática colestática (Rodrigues et al., 1998a; Rodrigues et al., 1998b).

### **3.3.1 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo**

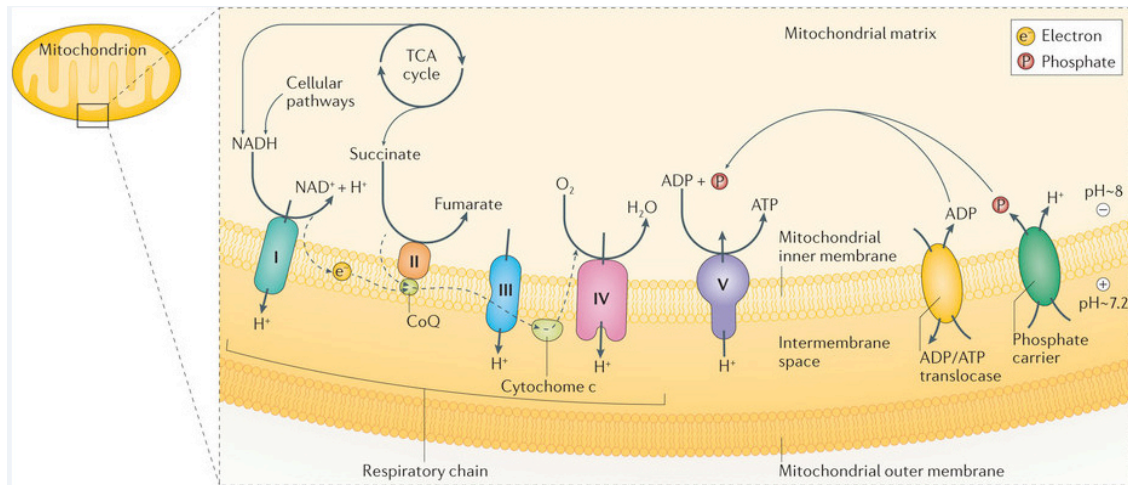
#### **3.3.1.1 Generación fisiológica de especies reactivas de oxígeno**

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) es un término colectivo, ampliamente empleado, que comprende todas aquellas especies reactivas que, siendo o no radicales libres, centran su reactividad en un átomo de oxígeno. Las EROs son moléculas ampliamente reconocidas como segundos mensajeros que actúan en una gran variedad de cascadas de señalización intracelular, ejerciendo un efecto deletéreo o beneficioso dependiendo de factores tales como su concentración, el estado fisiopatológico celular y el compartimento celular donde son generadas. Así, mientras que concentraciones intracelulares bajas o moderadas de EROs se relacionan con respuestas celulares fisiológicas como la defensa frente a una infección o la inducción de una respuesta mitogénica, la sobreproducción de EROs resulta en la generación de estrés oxidativo celular (Valko et al., 2007).

La formación celular de EROs es inherente al propio metabolismo aerobio, siendo su principal fuente el sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS). Inicialmente, el acetil coenzima A (acetil-CoA) procedente del metabolismo oxidativo de glúcidos (glucólisis), lípidos ( $\beta$ -oxidación) y proteínas (desaminación oxidativa,...), ingresa en el ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbónicos) donde, a través de una sucesión de reacciones químicas que tienen lugar en la matriz mitocondrial, se genera  $\text{CO}_2$ , precursores para otras biomoléculas y energía en forma de guanósín trifosfato (GTP) y de poder reductor. Este poder reductor, en forma de flavín adenín dinucleótido ( $\text{FADH}_2$ ) y nicotinamín adenín dinucleótido (NADH) reducidos, ingresa

finalmente en la última etapa del metabolismo oxidativo: la fosforilación oxidativa (Fig.12).

**Fig.12. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)** (Gorman et al., 2016).

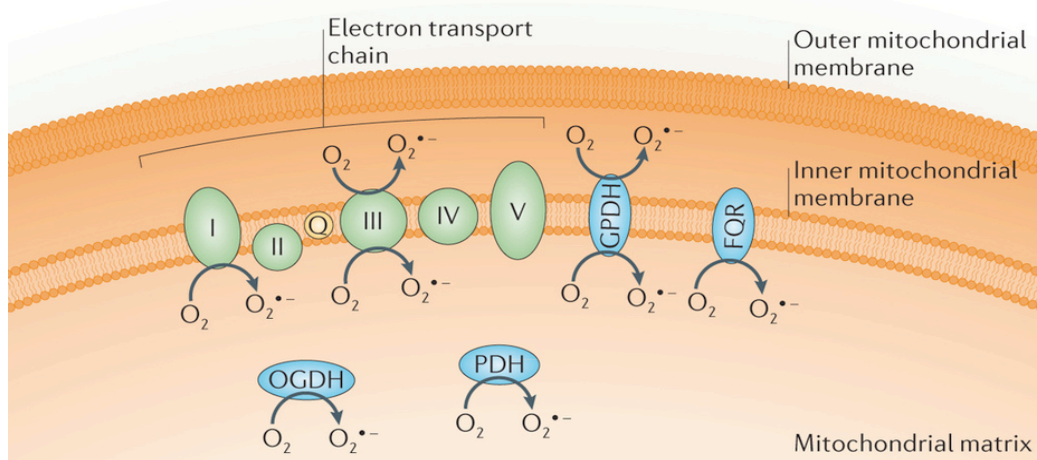


El sistema OXPHOS está constituido por una serie de complejos enzimáticos que forman la denominada cadena de transporte electrónico (CTE) mitocondrial: los complejos respiratorios I (CI; NADH deshidrogenasa o ubiquinona oxidoreductasa), CII (succinato deshidrogenasa), CIII (citocromo c reductasa o ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa) y CIV (citocromo c oxidasa), más dos transportadores de electrones móviles: la ubiquinona y el citocromo c. Además de estos, el sistema OXPHOS consta de un quinto complejo enzimático, denominado ATP sintasa o CV (Fig. 12). Todos estos componentes están localizados en la membrana interna mitocondrial, organizados de una forma que ha generado un intenso debate en los últimos quince años (Chance and Williams, 1955; Hackenbrock et al., 1986). En cualquier caso, durante la fosforilación oxidativa, la energía liberada a partir de la oxidación de los equivalentes reducidos que se generan en el metabolismo (NADH, FADH<sub>2</sub>), se utiliza para la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), la molécula universal que almacena y distribuye la energía en la célula. En dicho proceso, los electrones son transportados

a través de los complejos I-IV hasta el  $O_2$ , generando una energía que es utilizada para la translocación de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana, en contra del gradiente electroquímico. Este gradiente de protones es finalmente utilizado por el CV para la síntesis de ATP (Fig.12).

Durante todo el proceso, los electrones fluyen a través de los grupos flavina, centros sulfoferricos (Fe-S), grupos hemo e iones cobre ( $Cu^{2+}$ ) que poseen las proteínas de los complejos respiratorios. Sin embargo, cualquiera de estos grupos es susceptible de donar un electrón al  $O_2$  en lugar de al siguiente componente de la cadena, generándose así anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el cual está implicado en la fisiopatología de una gran variedad de enfermedades (Valko et al., 2006). Cuantitativamente, se considera que los principales sitios de producción de  $O_2^{\bullet-}$  en la célula son los complejos respiratorios mitocondriales CI y CIII. No obstante, en la mitocondria también existen otras enzimas metabólicas relacionadas con la generación de EROs, como son la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH), la piruvato deshidrogenasa (PDH), la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa de membrana (GPDH) y la flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa (FQR) (Murray et al., 2001) (Fig.13).

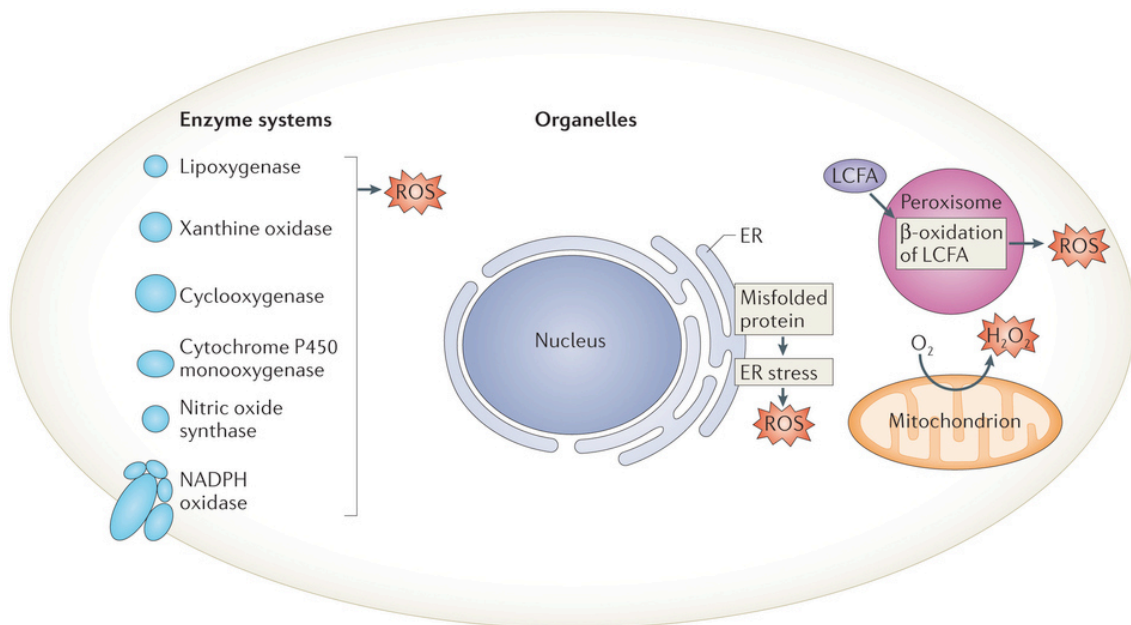
**Fig.13. Sitios de generación de EROs en la mitocondria.** La producción de EROs ocurre tanto en la matriz mitocondrial como en el espacio intermembrana.





Muchos otros procesos biológicos implican reacciones monoelectrónicas que generan radicales libres. Así, además de en la mitocondria, las EROs pueden generarse en otros compartimentos celulares como RE (particularmente, en el escenario de estrés de RE) y peroxisomas (como resultado del metabolismo de ácidos grasos de cadena larga). Además, muchas otras enzimas, incluyendo oxidasas y oxigenasas, producen EROs como parte de sus ciclos de reacción enzimática. Junto con la mitocondria, la fuente de EROs intracelular mejor caracterizada es la familia de enzimas NOX o NADPH oxidasas. Las NOX se localizan en la membrana plasmática y pueden catalizar la transferencia de un electrón desde el NADPH hasta el  $O_2$  con la formación concomitante de  $O_2^{\cdot-}$ . En un entorno inflamatorio, la activación de neutrófilos y macrófagos produce grandes cantidades de EROs a través de la NOX, jugando un papel fundamental en la defensa frente a patógenos (Rosen et al., 1995) (de Andrade et al., 2015). Otras enzimas celulares capaces de producir EROs son la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa (NOS), las ciclooxigenasas, las enzimas citocromo P450 y las lipooxigenasas (Holmstrom and Finkel, 2014) (Fig.14).

**Fig.14. Fuentes intracelulares de generación de EROs.**



La contribución relativa de cada una de estas fuentes adicionales de EROs varía en función del tipo celular. En este sentido, cabe destacar que el hígado es un órgano que depende en gran medida del metabolismo mitocondrial. Las mitocondrias son la principal fuente de energía en los hepatocitos (de ahí su elevado número) y juegan un papel fundamental en el metabolismo oxidativo, la supervivencia celular y la normal funcionalidad del hígado. Por tanto, no resulta extraño que numerosas patologías hepáticas cursen con disfunción de este orgánulo.

Las EROs están representadas por una variedad de especies, las cuales varían en función de su reactividad. En la Tabla 2 se presentan las principales EROs con mayor interés biológico.

**Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno comunes.**

<b>RADICALES LIBRES</b>	<b>NO RADICALES</b>
Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )	Ácido hipocloroso (HOCl)
Radical peroxilo ( $RO_2^{\bullet}$ )	Ácido hipobromoso (HOBr)
Radical alcoxi ( $RO^{\bullet}$ )	Ozono ( $O_3$ )
Radical hidroxiperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ )	Peróxido orgánico (ROOH)
	Ácido peroxinitroso (ONOOH)
	Perxoxinitrato ( $O_2NOO$ )
	Peroxinitrito (ONOO)

Entre las EROs más reactivas encontramos a los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de oxido-reducción (redox). Dentro de las células, el  $O_2^{\bullet-}$  es la EROs más comúnmente producida. Su elevada reactividad le permite reaccionar directamente con el óxido nítrico (NO)

formando una especie altamente reactiva como es el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que actúa como un fuerte oxidante. Por otro lado, el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  puede dismutar a un oxidante con actividad más moderada, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el cual es relativamente estable y fácilmente difusible, con una vida media más larga (Sanchez-Valle et al., 2012). Sin embargo, en presencia de metales pesados como el  $\text{Fe}^{2+}$ , el  $\text{H}_2\text{O}_2$  genera un radical extremadamente reactivo como es el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), responsable de la peroxidación lipídica y de la destrucción de los lípidos de membrana (Copple et al., 2010). Así pues, los radicales libres derivados del oxígeno representan la clase más importante de especies reactivas generadas en los organismos vivos (Miller et al., 1990).

### **3.3.1.2 Estrés oxidativo y defensa antioxidante celular**

El estrés oxidativo es un fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad del sistema biológico para detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Mientras que un estrés oxidativo moderado puede desencadenar el proceso de muerte celular programada o apoptosis, un estrés intenso se relaciona con la necrosis celular.

Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno está preservado por las enzimas y las moléculas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Alteraciones del estado redox normal pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de EROs, las cuales actúan dañando a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. De este modo, no es de extrañar que el estrés oxidativo esté implicado en el desarrollo de un gran número de enfermedades, como la diabetes, los desórdenes neurológicos, las enfermedades cardiovasculares, el proceso de envejecimiento y el cáncer (Valko et al., 2007). Para combatir el elevado número de enzimas que producen EROs, las células están equipadas de diversas y potentes defensas antioxidantes, necesarias para su

supervivencia. Este ‘arsenal’ constituye el sistema antioxidante celular y está formado por numerosas enzimas y moléculas. Cada una de estas enzimas antioxidantes tiene una función particular. Así, la superóxido dismutasa (SOD) actúa exclusivamente sobre el  $O_2^{\cdot-}$ , mientras que la catalasa y la peroxirredoxina (PRDX) lo hacen sobre el peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la glutatión peroxidasa (GPx) protege de los hidroperóxidos generados de forma endógena, catalizando la reacción de oxidación del glutatión hasta glutatión disulfuro, en presencia de  $H_2O_2$ . Adicionalmente, las células contienen moléculas antioxidantes no enzimáticas, de bajo peso molecular, como el ácido ascórbico (vitamina C), el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), el glutatión reducido (GSH), los carotenoides y los flavonoides, entre otros (Copple et al., 2010). Probablemente, de todos ellos, el más importante sea el GSH, un tripéptido no proteínico constituido por los aminoácidos cisteína, glutámico y glicina, y relacionado con el metabolismo de la glucosa, al depender su estado redox del NADPH que se produce a través de la vía de las pentosas fosfato.

### **3.3.1.3 Estrés oxidativo y daño hepático en la colestasis**

En el hígado, las distintas poblaciones celulares constituyentes son capaces de generar EROs y promover el estrés oxidativo bajo condiciones fisiopatológicas específicas. En este sentido, la peroxidación lipídica ha sido relacionada con la progresión de la lesión hepatocelular y la respuesta inflamatoria. Esto sugiere que dichas poblaciones celulares podrían ser responsables del estrés oxidativo generado durante la colestasis extrahepática experimental (Parola et al., 1996a).

A continuación, se incluye la contribución de las principales poblaciones celulares hepáticas a la producción de EROs:

- **Hepatocitos.** Puesto que las mitocondrias son la principal fuente celular de EROs, y los hepatocitos, los cuales constituyen el 90% de la masa celular del hígado, contienen un elevado número de ellas (entre 500-4.000 mitocondrias por hepatocito), resulta apropiado

considerar a esta población celular la principal responsable de estrés oxidativo en el hígado. Respecto a la colestasis, Huang y cols. observaron alteraciones de la actividad respiratoria mitocondrial en hepatocitos de ratas sometidas a ligadura del conducto biliar (BDL) (Huang et al., 2003). Del mismo modo, se ha visto que el metabolismo mitocondrial del hígado está alterado durante la colestasis extrahepática. Así, entre otros, cabe destacar la acumulación de piruvato y lactato, o la desregulación de la producción de glucosa y urea (Krahenbuhl et al., 1992). Por otro lado, el contenido mitocondrial en cada célula se encuentra regulado por la biogénesis mitocondrial. Cabe destacar que tanto la proliferación mitocondrial como el incremento del número de copias de ADN mitocondrial son mecanismos necesarios para mantener un volumen mitocondrial adecuado en la célula o tejido. En condiciones patológicas, el estrés oxidativo puede asociarse con alteraciones en la cantidad de mitocondrias y en el número de copias e integridad del ADN mitocondrial, demostrándose que el incremento del número de copias de ADN mitocondrial es el resultado de una respuesta celular compensatoria (Lee and Wei, 2005). Así, la disminución de la función mitocondrial se asocia con un incremento del volumen mitocondrial en hepatocitos procedentes de animales sometidos a BDL, y representa una estrategia para mantener el metabolismo energético hepático (Forestier et al., 1997).

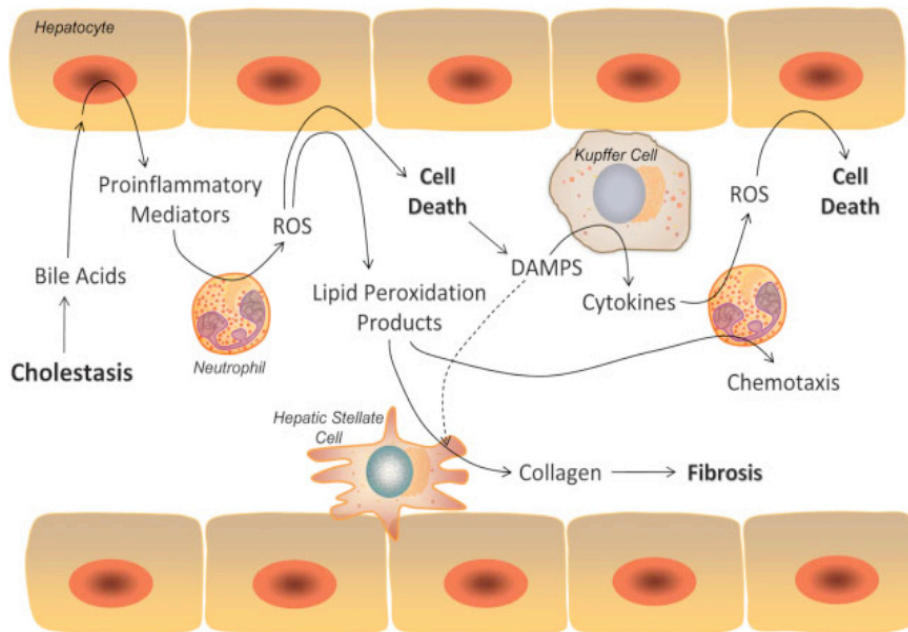
- **Neutrófilos.** Las citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (pequeñas proteínas que pertenecen a la familia de las citoquinas) producidas por los hepatocitos y células no parenquimales como consecuencia del estrés oxidativo inducido por ácidos biliares, provocan la quimiotaxis y activación de las células inflamatorias o neutrófilos, los cuales generan daño hepático (Copple et al., 2010) a través de la actividad NOX y la formación de ácido hipocloroso, a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cloruro (Jaeschke, 1995). Así, la prevención de la acumulación de neutrófilos (Gujral et al., 2003) y la inhibición de la actividad NOX2 (Gujral et al., 2004a) han sido relacionadas con un menor daño

hepático. Del mismo modo, ratones deficientes en la enzima antioxidante GPx, presentan un mayor daño hepático inducido por neutrófilos. Estos resultados sugieren que los neutrófilos juegan un papel crítico durante la colestasis obstructiva a través de la generación de EROs y otros oxidantes. Además, cuando su función se ve perjudicada, la toxicidad de los ácidos biliares es más limitada.

- **Células de Kupffer.** Del mismo modo, tras la BDL, las células de Kupffer actúan como una importante fuente de ERO y citoquinas, generando una respuesta inflamatoria durante la fase inicial y posteriormente, participando en el desarrollo de fibrosis (Ito et al., 2003; Melgert et al., 2001). Además, las células de Kupffer poseen una marcada actividad NOX que causa daño celular directo por estrés oxidativo.

En la Fig.15 se resume el mecanismo de producción de EROs durante la colestasis, a partir de las poblaciones celulares descritas. Los ácidos biliares estimulan la producción de mediadores proinflamatorios en los hepatocitos, activando a los neutrófilos. Estos, a su vez, liberan EROs que dañan a los hepatocitos e inducen la liberación de moléculas asociadas al daño (DAMPs), las cuales amplifican el daño hepático mediante (1) la estimulación de la liberación de citoquinas en las células de Kupffer, (2) la activación directa de los neutrófilos y (3) la estimulación de la síntesis de colágeno en las células estrelladas, promoviendo la fibrosis. Las EROs también causan peroxidación lipídica, generando quimiotácticos para los neutrófilos y participando en la activación de células estrelladas, que producen colágeno (Copple et al., 2010).

**Fig.15. Fuentes intracelulares de generación de EROs.**



Como prueba de que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental durante el daño hepático colestásico, el tratamiento con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) se asocia a una menor presencia de EROs, una reducción de la peroxidación lipídica, un incremento de la actividad enzimática antioxidante y una disminución del daño celular en homogenados hepáticos de animales sometidos a BDL (Pastor et al., 1997). A nivel hepático, la peroxidación lipídica se ha relacionado con una alteración de los mecanismos de defensa antioxidantes, promoviendo la muerte celular en cobayas sometidas a obstrucción biliar (Engin et al., 2006). Del mismo modo, existen claras evidencias del papel del estrés oxidativo durante la enfermedad colestásica en humanos. Kitada y cols. detectaron el marcador 8-hidroxideoxiguanosina (uno de los principales productos de la oxidación del ADN) en secciones hepáticas procedentes de pacientes de CBP (Kitada et al., 2001). Estudios similares en pacientes con obstrucción biliar revelaron un incremento en los niveles de malondialdehído (MDA; producto final de la peroxidación lipídica) y un descenso en los niveles

de glutatión total. En estos, la aplicación de un drenaje biliar se asoció a un rápido descenso en los niveles de MDA (Vendemiale et al., 2002). De forma similar, los niveles plasmáticos de MDA y los niveles plasmáticos y urinarios de 8-isoprostano (producto de la peroxidación del ácido araquidónico) fueron elevados en el grupo de pacientes con CBP (Aboutwerat et al., 2003).

Existe un gran número de publicaciones científicas donde se demuestra que los ácidos biliares pueden actuar como inductores de la generación de estrés oxidativo, siendo tóxicos para los hepatocitos cuando están expuestos a elevadas concentraciones. Sokol y cols. demostraron que la administración de TCDCA y ácido taurolitocólico (TLCA) incrementan los niveles de MDA y disminuyen la viabilidad celular en cultivos de hepatocitos de rata. De nuevo, el tratamiento con antioxidantes redujo la peroxidación lipídica y mejoró la viabilidad celular. Por el contrario, la administración de TUDCA y TCA no se asoció con este efecto deletéreo, sugiriendo que durante la colestasis el estrés oxidativo podría ser específico del ácido biliar (Sokol et al., 1993). En estudios posteriores, la incubación con CDCA estimuló la generación de hidroperóxidos en mitocondrias aisladas procedentes de hepatocitos (Sokol et al., 1995). Resultados similares fueron reportados por Fang y cols., donde la incubación de los hepatocitos con DCA estimuló la generación de EROs, siendo esta inhibida por los antioxidantes NAC y Trolox (análogo de la vitamina E), ciclosporina A (bloquea la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial) o ácido bongkreónico (inhibidor de la fosforilación oxidativa). Además, la producción de EROs inducida por DCA se redujo en células rho 0 de hepatoma, las cuales carecen de ADN mitocondrial y, por tanto, de una cadena respiratoria funcional (Fang et al., 2004). Estos resultados proponen a la mitocondria como el orgánulo responsable de la generación de EROs en los hepatocitos expuestos a concentraciones tóxicas de ácidos biliares. A pesar de todo ello, los hepatocitos son especialmente resistentes al estrés oxidativo y a la peroxidación lipídica.



Además del incremento de estrés oxidativo celular, se ha observado que, durante la colestasis, los niveles de los sistemas antioxidantes celulares están disminuidos a nivel hepático y en el suero, contribuyendo al incremento de dicho estrés (Singh et al., 1992). Así, ha sido establecido que, para que el estrés oxidativo tenga un impacto relevante sobre los hepatocitos se requiere un incremento en la formación de EROs y una alteración del contenido antioxidante celular (Copples et al., 2010; Parola et al., 1996a).

La producción de EROs no solo daña a los hepatocitos sino que actúa como un importante estímulo en la generación de fibrosis hepática. Así, la continua exposición a productos derivados de la peroxidación lipídica estimula la síntesis de colágeno en las células estrelladas, lo cual constituye un fenómeno clave en el desarrollo de fibrosis hepática (Parola et al., 1996b). Además, el incremento de la actividad NOX en este tipo celular se relaciona con la generación de EROs, propiciando del mismo modo la síntesis de colágeno (Fig. 15) (Bataller et al., 2003).

#### **3.3.1.4 Estrategias antioxidantes.**

Entre las distintas moléculas utilizadas en diferentes modelos de estrés oxidativo celular, destacan por su elevada capacidad antioxidante NAC, tetrakis (ácido 4-benzoico) porfirina de manganeso (MnTBAP) y MitoQuinona o MitoQ. Debido a que todas ellas han sido utilizadas en el presente trabajo de tesis doctoral, a continuación se describen brevemente su naturaleza, reactividad y utilidad frente a la toxicidad hepática:

- **N-acetilcisteína** es un conocido antioxidante con capacidad de eliminar los radicales OH<sup>•</sup>. Se trata de un precursor acetilado del aminoácido L-cisteína, donador del grupo sulfidrilo, con capacidad para atravesar la membrana plasmática e hidrolizarse intracelularmente hasta cisteína, permitiendo la síntesis de GSH (Wu et al., 2004). El GSH es el compuesto tiólico no proteico más abundante en las células de

mamíferos, y se considera la primera defensa antioxidante celular. Los residuos sulfidrilos de la cisteína son altamente reactivos y permiten al GSH conjugarse con compuestos tóxicos con ayuda de la glutatión transferasa, haciéndolos más solubles en agua y favoreciendo su metabolización y excreción. Adicionalmente, el GSH actúa como cosustrato en reacciones donde participan las peroxidasas, protegiendo a las células del daño oxidativo inducido por  $H_2O_2$  (Gonzalez et al., 2009). Por tanto, el mantenimiento del contenido celular de GSH es esencial para una adecuada funcionalidad celular. Respecto a las células hepáticas, ha sido ampliamente demostrado el papel protector de NAC frente al daño oxidativo en diferentes modelos de hepatotoxicidad *in vitro* (Colell et al., 1998) e *in vivo* (Uedono et al., 1997). Así, NAC ha sido empleado frente a la hepatotoxicidad inducida por sobredosis con paracetamol (De Vries and De Flora, 1993), en el tratamiento de la cirrosis hepática inducida por  $CCl_4$  (Pereira-Filho et al., 2008) y por dimetilnitrosamina (Pereira-Filho et al., 2008), o en pacientes con fallo hepático fulminante (Harrison et al., 1991). Entre los efectos protectores del NAC han sido propuestos la restauración de la membrana plasmática y de la función mitocondrial. En este sentido, NAC previene la inhibición inducida por etanol de la ATPasa de  $Na^+/K^+$  de la membrana plasmática, en hepatocitos de rata (Pascale et al., 1989). Del mismo modo, protege a los hepatocitos de ratón frente al daño respiratorio producido por exposición a concentraciones tóxicas de paracetamol, el cual se relaciona con una disminución de los niveles de ATP y una mayor relación lactato/piruvato (Burcham and Harman, 1990). En cuanto a la colestasis, el GSH juega un importante papel en la formación de la bilis y en su transporte hacia los espacios canaliculares (Grattagliano et al., 2005). Además, participa en la regulación del transporte de solutos orgánicos hacia la bilis y en la eliminación de compuestos tóxicos, derivados del metabolismo hepático (Lee et al., 2001). No resulta extraño, pues, que la disminución del contenido de GSH y la alteración de su estado redox hayan sido

relacionadas con la retención y acumulación de ácidos biliares, el desarrollo de estrés oxidativo y la activación de las vías de muerte celular. Por ello, el empleo de agentes precursores de GSH, como el NAC, podría resultar de especial interés en el tratamiento de las enfermedades colestásicas (Portincasa et al., 2007; Tahan et al., 2007). Galicia-Moreno y cols. evaluaron la capacidad antioxidante de NAC sobre la prevención del daño hepático crónico inducido por la ligadura del conducto biliar (BDL), observando una reducción de la peroxidación lipídica y una normalización de la actividad catalasa y del contenido de GSH. Además, los niveles de citoquinas relacionadas con el desarrollo de fibrosis y citoquinas inflamatorias fueron atenuados por NAC (Galicia-Moreno et al., 2012). Pastor y cols. obtuvieron resultados similares, asociando la administración de NAC con la preservación de la fluidez de la membrana plasmática y la protección del sistema antioxidante (Pastor et al., 1997). Por otro lado, Tahan y cols. observaron que, si bien la administración intraperitoneal de NAC mejoraba ciertos parámetros de estrés oxidativo y daño celular en ratas sometidas a BDL, resultaba ineficiente como agente antifibrótico, quizás debido a la escasa duración del tratamiento (Tahan et al., 2007). A nivel clínico, el tratamiento con NAC (800 mg/día), como monoterapia o en combinación con UDCA, en pacientes con CEP ejerce efectos positivos al reducir los niveles séricos de transaminasas, bilirrubina y fosfatasa alcalina, sin causar efectos secundarios graves. Además, gracias a su actividad mucolítica, el tratamiento con NAC reduce la absorción de agua en los colangiocitos e incrementa el contenido de la misma en la mucosa, disminuyendo la viscosidad de la bilis y favoreciendo su drenaje en pacientes con obstrucción biliar (Ozdil et al., 2011; Ozdil et al., 2010).

- **MnTBAP** es un compuesto no tóxico de bajo peso molecular y vida media corta. Conocido por ser un mimético sintético no peptídico de la SOD, MnTBAP puede atravesar las membranas celulares para neutralizar el  $O_2^{\cdot-}$  acumulado en los compartimentos celulares,

catalizando su dismutación hasta  $H_2O_2$  y  $O_2$ , mediado por un cambio de valencia del metal de Mn (III) a Mn(II), de manera similar a como ocurre en la SOD nativa (Patel and Day, 1999). Así, MnTBAP protege frente al daño oxidativo cuando este es mediado por  $O_2^{\bullet-}$ . En este sentido, el empleo de MnTBAP protegió a ratones *knock-out* para SOD2 frente al desarrollo de cardiomiopatías, la acumulación hepática de lípidos y el daño neurodegenerativo causado por una excesiva acumulación de EROs, así como de la muerte neonatal temprana, revirtiendo el fenotipo letal y prolongando la esperanza de vida (Melov et al., 1998). No obstante, el empleo de MnTBAP como una SOD específica ha sido cuestionado. Aun así, en las preparaciones comerciales de MnTBAP aparecen restos de especies de Mn no porfirínicas, como impurezas, que, aunque inestables, poseen una gran efectividad en la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  (Batinic-Haberle et al., 2009; da Silva et al., 2008). Por tanto, aunque aparezcan en pequeñas trazas, estas impurezas presentan una gran actividad SOD (Batinic-Haberle et al., 2010). Por otra parte, el MnTBAP posee actividad catalasa (Day et al., 1997). Si bien en los compuestos miméticos de SOD dicha actividad es inferior al 1% comparado con las catalasas endógenas. A pesar de ello las porfirinas de Mn son capaces de proteger a la células frente a concentraciones tóxicas de  $H_2O_2$  (Patel and Day, 1999). Debido a su capacidad antioxidante, MnTBAP resulta un potente inhibidor de la peroxidación lipídica, siendo esta propiedad dependiente del metal de transición (Mn) ligado a la porfirina (Day et al., 1999; Patel and Day, 1999). Además, MnTBAP presenta la capacidad de eliminar peroxinitritos generados a partir de la combinación del ON con el  $O_2^{\bullet-}$  (Szabo et al., 1996; Zingarelli et al., 1997). Todas estas propiedades hacen de MnTBAP un excelente candidato con potencial aplicabilidad clínica, habiéndose demostrado su eficacia en una gran variedad de modelos *in vitro* e *in vivo* de enfermedades humanas que cursan con estrés oxidativo (Hachmeister et al., 2006; Malassagne et al., 2001). Además, e íntimamente relacionado con su capacidad antioxidante, MnTBAP

previene la muerte celular por apoptosis. En cultivos de neuronas motrices, el mimético de la SOD resulta eficaz frente a la apoptosis inducida por la presencia de  $O_2^{\bullet-}$  y ON (Estevez et al., 1998). De manera similar, Hildeman y cols. demostraron que MnTBAP previene a las células T de la apoptosis a través de su capacidad para disipar el potencial de membrana, frenar la acumulación de  $O_2^{\bullet-}$  e inhibir la activación de las caspasas (Hildeman et al., 1999). Los efectos antioxidantes y antiapoptóticos de MnTBAP se han relacionado con su capacidad para acceder al interior de orgánulos claves como la mitocondria debido a su baja carga iónica, difundiendo eficazmente a través de la membrana plasmática, de manera opuesta a lo que ocurre con otras metaloporfirinas cargadas positivamente (Patel and Day, 1999). Existen diversos estudios que proponen a MnTBAP como candidato para el tratamiento de distintas patologías hepáticas. Así, en un modelo murino de enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), la administración de MnTBAP previno ciertos cambios relacionados con dicha patología hepática, incluyendo una menor actividad del sistema OXPHOS mitocondrial, un mayor estrés oxidativo y nitrosativo, y un incremento de parámetros relacionados con la muerte celular (Garcia-Ruiz et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2014). De manera similar, el tratamiento con MnTBAP en ratones obesos ob/ob, los cuales presentan un defecto en la síntesis de leptina que reproduce muchos de los problemas metabólicos de los pacientes de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA; una afección más grave de la EHGNA), se asoció a una recuperación de la actividad de la CTE mitocondrial, una menor nitración en tirosina y una marcada regresión de la esteatosis hepática y de la inflamación (Garcia-Ruiz et al., 2006). González y cols. evaluaron las propiedades citoprotectoras de MnTBAP en un modelo *in vitro* de fallo hepático fulminante inducido por D-galactosamina, una hexosamina derivada de la galactosa, con propiedades hepatotóxicas. En este estudio, MnTBAP se asoció con recuperación del cociente GSH/GSSG, una menor presencia de EROs,

la restauración de la actividad de la CTE mitocondrial y la inhibición de la muerte de hepatocitos primarios humanos (Gonzalez et al., 2009). En otro modelo murino de daño hepático inducido por acetaminofeno o paracetamol, un fármaco con propiedades analgésicas y antipiréticas que puede resultar hepatotóxico en dosis excesivas, la administración de MnTBAP de manera preventiva o curativa, incrementó la actividad GPX, redujo los niveles de transaminasas en suero y las lesiones generadas en el parénquima hepático, mejorando la supervivencia de los animales (Ferret et al., 2001). Resultados similares a estos fueron descritos cuando se utilizó MnTBAP como tratamiento en ratones con fallo hepático fulminante inducido por un agonista de FasL. En estos, además, el antioxidante restauró el potencial de membrana e inhibió la liberación de citocromo c y la activación de caspasa-3 y -9 (Malassagne et al., 2001). En relación con la enfermedad colestásica, la administración de citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$ ) estimula la generación de ON mediado por la NOS-2 en células del epitelio biliar, lo cual se relaciona con el desarrollo de colestasis ductular a través de un mecanismo que implica la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNOs). En este sentido, la administración de MnTBAP en un cultivo primario de una línea celular no tumoral de colangiocitos de rata, inhibió los efectos colestásicos de las citoquinas proinflamatorias y el ON, mediante la inhibición de las RNOs el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Spirli et al., 2003).

- **MitoQ** es un antioxidante derivado de la ubiquinona que se encuentra unido covalentemente a un catión lipofílico de trifenilfosfonio a través de una cadena carbonada alifática, para ser dirigido a la mitocondria. La ubiquinona, como componente de la CTE, acepta dos electrones del CI ó CII y se reduce hasta ubiquinol. A continuación, participa en la transferencia de electrones desde el CI ó CII hasta el CIII. El ubiquinol generado es considerado un antioxidante eficiente para la protección de los complejos enzimáticos y los lípidos de la membrana mitocondrial interna, frente a los radicales libres producidos por la CTE

(Kelso et al., 2001). No obstante, la baja solubilidad de la ubiquinona en agua dificulta su uso en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Del mismo modo, la coenzima Q<sub>10</sub> (la forma endógena de la ubiquinona en humanos) posee una biodisponibilidad ineficiente debido a su elevada hidrofobicidad. Así, pese a sus efectos terapéuticos, solo una pequeña fracción de la molécula alcanza la circulación sistémica tras su administración oral, observándose un incremento muy pobre del contenido de coenzima Q<sub>10</sub> mitocondrial (James et al., 2005). Con el objetivo de desarrollar una nueva ubiquinona artificial, con una mejorada biodisponibilidad y farmacocinética, capaz de alterar el contenido de ubiquinona mitocondrial, Kelso y cols. sintetizaron el MitoQ. El catión lipofílico que contiene, le permite al MitoQ atravesar fácilmente la membrana plasmática y acumularse en la mitocondria, impulsado por el gran potencial de membrana mitocondrial. Allí, el MitoQ es reducido hasta ubiquinol, su forma antioxidante (Kelso et al., 2001), gracias al CII, ya que no es un buen sustrato para el CI (James et al., 2005). Además, MitoQ no puede restaurar la respiración mitocondrial en ausencia de coenzima Q ya que su forma reducida, el ubiquinol, es pobremente oxidado por el CIII al no actuar como transportador de electrones. Así pues, una vez que ha actuado como antioxidante, el ubiquinol se recicla por la CTE a través de su oxidación hasta ubiquinona y su posterior reducción por el CII, restaurando así su eficacia antioxidante (Kelso et al., 2001; Smith and Murphy, 2010). Distintos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* han mostrado la eficacia de MitoQ. Por ejemplo, la administración de MitoQ protege frente a la peroxidación lipídica y la alteración de la función mitocondrial en células de osteosarcoma humano (James et al., 2005), en células endoteliales sometidas a daño inducido por nitroglicerina (Esplugues et al., 2006) o por hipertensión (Graham et al., 2009), o en células fetales hepáticas expuestas a ácido hipocloroso, como símil de estrés por cloración durante la inflamación crónica (Whiteman et al., 2008). Además de estos, existen distintos modelos animales de

enfermedades que cursan con daño oxidativo mitocondrial, donde se demuestra la eficacia y seguridad en el uso de MitoQ. Así, MitoQ protege de manera eficaz frente al daño celular inducido por el hígado graso, la enfermedad neurodegenerativa, el daño renal y/o hepático por diabetes Mellitus tipo I o por isquemia-reperfusión, el daño hepático por infección crónica por VHC, el daño cardiaco inducido por el doxorubicina o la sepsis (Adlam et al., 2005; Chandran et al., 2009; Gane et al., 2010; Lowes et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2012; Paradies et al., 2004; Smith and Murphy, 2010). Por tanto, MitoQ puede resultar eficaz en el tratamiento de otras enfermedades hepáticas crónicas donde el daño oxidativo mitocondrial está presente, como la enfermedad de hígado graso no alcohólico o la colestasis. No obstante, hasta la fecha, no se conocen estudios donde se proponga a MitoQ como terapia alternativa o complementaria al tratamiento tradicional para el manejo de la enfermedad colestásica. Sin embargo, sí que han sido registrados niveles plasmáticos de coenzima Q reducidos en mujeres con CIE y en ratas con colestasis inducida por etinilestradiol (estradiol relacionado con el desarrollo de CIE). Dicha observación ha sido relacionada con el incremento de los ácidos biliares hidrofóbicos en el suero, lo cual potenciaría el estrés oxidativo. En este caso, la suplementación con coenzima Q podría suponer una mejora del tratamiento convencional (Martinefski et al., 2014). En otro estudio piloto, un total de 24 pacientes de CBP fueron aleatorizados en dos grupos: mientras que al grupo 1 se le administró una preparación antioxidante compuesta por selenio, metionina,  $\beta$ -caroteno, vitamina C y vitamina E, el grupo 2 recibió Bio-quinona Q10, un fármaco compuesto por coenzima Q10 y  $\alpha$ -tocoferol. En dicho estudio, la terapia antioxidante combinada del grupo 2 mejoró los síntomas de prurito y fatiga en una proporción significativa de pacientes. Por el contrario, en el grupo 1 únicamente se observó una leve mejoría en la fatiga (Watson et al., 1999).

-



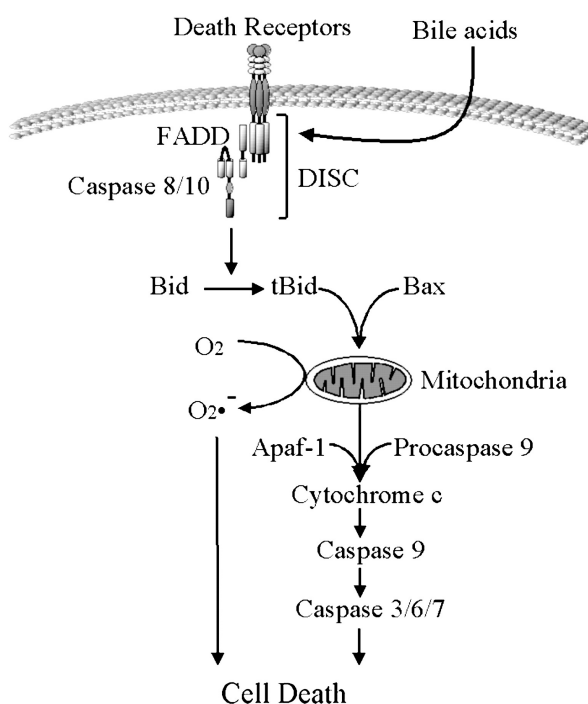
### **3.3.2 Muerte celular**

Las células proliferativas, quiescentes y post-mitóticas pueden ser eliminadas en cualquier momento de su ciclo celular. Esta eliminación puede estar mediada por mecanismos internos celulares o por la acción de agentes externos. Pese a que han sido descritos diversos tipos de muerte celular, las dos vías principales son la apoptosis y la necrosis; sin embargo, aunque tienen como final común la eliminación de la célula afectada, ambos procesos tienen un inicio o desencadenante diferente y utilizan sistemas distintos. A continuación se describen estas dos vías principales de muerte celular y su relación con la toxicidad inducida por los ácidos biliares.

#### **3.3.2.1 Apoptosis hepatocelular**

Numerosos estudios han relacionado la citotoxicidad de los ácidos biliares con la disfunción mitocondrial a través de la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, que favorece la formación del poro de transición mitocondrial. La apertura de dicho poro constituye un fenómeno ampliamente aceptado durante la muerte celular programada (Rolo et al., 2000). Durante el proceso de apoptosis, el potencial de membrana se altera y la cadena respiratoria queda desestabilizada, disminuyendo la actividad del complejo respiratorio III e inhibiéndose la síntesis de ATP (Krahenbuhl et al., 1994). Este suceso favorece la fuga de electrones a través del complejo III y, por consiguiente, la producción de EROs, la peroxidación lipídica, la pérdida de viabilidad celular y la apertura del poro de transición mitocondrial. En consecuencia, se produce la liberación de proteínas reguladoras de la apoptosis como el citocromo c. El citocromo c se asocia con la proteína Apaf-1 y con la procaspasa-9, formando el apoptosoma, responsable de la activación de las caspasas 3 y 7, las cuales son las encargadas en última instancia de ejecutar la apoptosis hepatocelular (Higuchi and Gores, 2003; Rodrigues et al., 1998a; Zamzami et al., 1995).

La acción proapoptótica de las sales biliares se ha relacionado igualmente con la activación del receptor de muerte FasR o CD95, altamente expresado a nivel hepático, por lo que ejerce un papel clave en la homeostasis y en la fisiopatología hepática (Guicciardi and Gores, 2002). Tras su activación y oligomerización, FasR recluta al adaptador FADD (dominio de muerte asociado a Fas), que activa a las caspasas 8 y 10, formando el complejo DISC en presencia o no de su ligando FasL (Fig.16) (Faubion et al., 1999; Higuchi and Gores, 2003).



**Fig.16. Los ácidos biliares activan la vía de señalización de muerte celular mediada por el receptor FAS.** Los ácidos biliares tóxicos inducen la oligomerización de los receptores de muerte celulares mediante mecanismos dependientes o independientes de ligando. A continuación, se inicia el proceso de apoptosis mediante el reclutamiento de FADD y las procaspasas-8/10 al complejo DISC. Dicho proceso ocurre con la formación de estrés oxidativo.

En la literatura se han descrito diversos mecanismos que pueden regular la activación del receptor de muerte de manera independiente a la unión a su ligando o FasL. De hecho, existen estudios *in vivo* que lo confirman, observándose una disminución de la apoptosis hepatocelular en ratones deficientes en FasR sometidos a ligadura del conducto biliar, pero no en ratones deficientes para el ligando de muerte, lo que indicaría un efecto activador del receptor de forma independiente de su ligando. No obstante, en los ratones deficientes en FasR, la prevalencia de la colestasis se ha relacionado con un

incremento de la muerte celular, sugiriéndose por tanto la existencia de un mecanismo compensatorio e independiente de FasR (Miyoshi et al., 1999)

Estudios posteriores han demostrado que la apoptosis mediada por GCDCA en células de hepatoma HuH-7 deficientes en FasR, se relaciona con una mayor expresión del receptor de muerte DR5 o TRAIL-R2, y, como consecuencia, con una mayor oligomerización y activación del receptor, sensibilizando a las células al ligando TRAIL (Higuchi et al., 2001a). Asimismo, en modelos de colestasis extrahepática donde se observa un incremento de la expresión de TRAIL-R2, la administración del ligando TRAIL sensibiliza a los animales al daño hepático, comparado con el grupo de animales sometidos a ligadura del conducto biliar (Higuchi et al., 2002). Otros estudios han demostrado que la activación de los receptores de muerte de manera independiente a FasL puede estar relacionado con el incremento en la densidad de receptores de muerte sobre la superficie celular. De hecho, el receptor FasR se encuentra secuestrado en los reservorios intracelulares en condiciones basales. Sin embargo, se ha observado que durante la toxicidad inducida por los ácidos biliares FasR es transportado en vesículas desde el complejo de Golgi hasta la membrana plasmática, aumentando su densidad sobre la superficie celular e iniciándose la cascada de muerte (Sodeman et al., 2000). Esto favorece la oligomerización y activación de FasR y el procesamiento de Bid dependiente de caspasa-8. La forma truncada de Bid es transportada a la mitocondria, favoreciendo la translocación y/o la inserción de Bax y/o Bak en la membrana mitocondrial. Estos son miembros de la familia Bcl-2, esenciales para la liberación de los factores proapoptóticos mitocondriales, entre ellos el citocromo c, a través de la apertura del poro mitocondrial (Fig. 16) (Higuchi and Gores, 2003; Li et al., 1998; Malhi et al., 2010).

Higuchi y cols. demostraron que la inhibición de Bid previene la apoptosis mediada por sales biliares en hepatocitos de ratón deficientes

en FasR, sugiriendo que la citotoxicidad ejercida por las sales biliares podría ser dependiente de Bid (Higuchi et al., 2001b). Otro mecanismo de regulación de la apoptosis mediada por el receptor FasR, independientemente de la presencia del ligando, ocurre a nivel del complejo DISC. En ese punto, la presencia de ácidos biliares previene el reclutamiento de la proteína inhibidora de la apoptosis cFLIP, tras ser fosforilada por los ácidos biliares, promoviendo así el inicio de la cascada de muerte (Higuchi and Gores, 2003). Del mismo modo, la inhibición de la proteasa cathepsina B en este mismo sistema de toxicidad por sales biliares independiente de FasL, atenúa el proceso apoptótico (Faubion et al., 1999).

### **3.3.2.2 Necrosis hepatocelular**

La muerte celular por necrosis ocurre como consecuencia de una lesión celular grave asociada a una alteración metabólica con reducción de ATP. Se caracteriza por la hinchazón celular moderada, asociada a la formación de ampollas o vesículas en la membrana plasmática, la despolarización de la membrana mitocondrial y la rotura lisosomal, la cual permite la liberación de enzimas hidrolíticas al citoplasma. Durante este proceso, la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática provoca el colapso del gradiente iónico intra/extra-celular. Con el propósito de mantener el equilibrio osmótico, los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  entran en la célula acompañados de agua y, como consecuencia, diversos orgánulos celulares (mitocondrias, RE, etc.) sufren un proceso de hinchazón y fragmentación intracelular, y la célula en su conjunto se ve sometida a un proceso de turgencia. Estos acontecimientos desembocan en un fenómeno de vacuolización de la membrana plasmática que, en contraste con el proceso apoptótico, origina vacuolas desprovistas de orgánulos celulares. Finalmente, todo el contenido celular se libera al entorno extracelular en un proceso que puede ir acompañado de una respuesta inflamatoria (Malhi et al., 2006; Malhi et al., 2010).

A pesar de que la hipótesis más aceptada señala a la apoptosis como el principal mecanismo de toxicidad de los ácidos biliares hidrofóbicos durante la enfermedad hepática colestática, existen trabajos que sugieren que el daño sobre el parénquima hepático ocurre a través de un proceso de necrosis inflamatoria. En ellos, la mínima activación de la ruta apoptótica no se relaciona con el desarrollo de inflamación ni con el daño hepático observado durante la colestasis (Gujral et al., 2004b). Así, la ligadura del conducto biliar en ratones no se asocia con el incremento de la actividad caspasa ni con evidencias morfológicas relacionadas con el proceso apoptótico (Fickert et al., 2005). En consonancia, la inhibición de las caspasas no afecta al daño hepatocelular durante la colestasis (Gujral et al., 2004b). El análisis de los biomarcadores de necrosis como la citoqueratina-18, la proteína del grupo de alta movilidad-1 (HMGB1) o el microRNA-122, revelan que la muerte celular durante la colestasis obstructiva en ratones está asociada a un proceso necrótico (Woolbright et al., 2013). Estos resultados han sido confirmados en pacientes colestásicos, observándose un aumento sérico de la citoqueratina-18 y HMGB1, sin obtener valores detectables para la caspasa-3 (Woolbright et al., 2015). La ausencia apoptosis durante la colestasis extrahepática *in vivo* se ha relacionado con la liberación de citoquinas capaces de activar la transcripción del FT nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), relacionado con la inducción de la expresión de genes antiapoptóticos (Schoemaker et al., 2003).

En el mismo sentido, durante la colestasis aguda, la vía de señalización de Fas se asocia con la disfunción mitocondrial severa y consiguiente reducción de los niveles de ATP. Esto ha sido relacionado con la inhibición de las caspasas y la promoción de la muerte celular por necrosis. Sin embargo, el bloqueo del flujo biliar que ocurre durante la enfermedad colestásica en humanos, es un proceso más lento que la repentina y total obstrucción que se produce tras la ligadura del conducto biliar en modelos de colestasis *in vivo*. Este hecho provoca que la disfunción mitocondrial inducida por Fas sea menos acusada,

preservándose parcialmente el contenido de ATP y el proceso de necrosis, en beneficio de la activación de la ruta apoptótica. Por lo tanto, partiendo de una ruta de señalización común es posible activar las dos vías de muerte celular, apoptosis y necrosis, desarrollándose una u otra en función del diagnóstico de la enfermedad colestática. Así, mientras que durante la colestasis aguda prevalece la muerte celular por necrosis, es más frecuente la activación de la ruta apoptótica durante la colestasis crónica. En estadios intermedios de la enfermedad, coexistirían ambos tipos de muerte celular (Malhi et al., 2006).

### **3.4 Ácido glicoquenodesoxicólico**

Los hepatocitos están sometidos a la exposición constante de los ácidos biliares presentes en la sangre, por lo que el aumento significativo de su concentración se ha relacionado con el desarrollo de toxicidad hepática. En individuos sanos, la concentración de ácidos biliares presentes en la vena porta y en el suero, es de aproximadamente 20 $\mu$ M, pudiendo alcanzar concentraciones de hasta 300 $\mu$ M en pacientes colestásicos (Liang et al., 2013). Actualmente, existe un considerable número de publicaciones científicas centradas en la acumulación de los ácidos biliares como mecanismo principal de toxicidad durante la colestasis. Estos trabajos se basan en el empleo del ácido GCDCA sobre cultivos primarios de hepatocitos de roedores (Spivey et al., 1993) o de líneas celulares de hepatoma (Verhaag et al., 2016). Como se ha descrito anteriormente, el GCDCA es la forma conjugada con glicina del ácido biliar primario CDCA, el cual es más tóxico que el CA. Los ácidos biliares conjugados con glicina, además de ser más citotóxicos que los conjugados con el aminoácido taurina, son más abundantes. Durante la colestasis, el porcentaje de CDCA conjugado con glicina llega a ser superior al 95% (Crosignani et al., 1991) (Spivey et al., 1993), siendo además el GCDCA uno de los ácidos biliares mayoritarios en el suero de pacientes colestásicos (Tabla 3)

(Woolbright et al., 2015). Este hecho sugiere que el mecanismo de citotoxicidad asociado a GCDCA podría resultar relevante para el diseño de nuevas terapias para el tratamiento de las enfermedades colestásicas.

**Tabla 3. Niveles de los ácidos biliares en bilis y suero durante la enfermedad colestásica.** UI (pacientes sin daño hepático); CLI (pacientes con daño hepático colestásico) (Woolbright et al., 2015).

Bile acid	Bile		Serum	
	UI patient ( $\mu\text{M}$ )	CLI patient ( $\mu\text{M}$ )	UI patient ( $\mu\text{M}$ )	CLI patient ( $\mu\text{M}$ )
LCA	<10	<10	<0.1	<0.1
UDCA	67 $\pm$ 20	71 $\pm$ 20	<0.1	<0.1
CDCA	<10	<10	0.9 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1
DCA	116 $\pm$ 100	25 $\pm$ 16	1.0 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>*,#</sup>
CA	<10	<10	<0.1	<0.1
TCA	2403 $\pm$ 223	2460 $\pm$ 295	0.4 $\pm$ 0.1	11.7 $\pm$ 4.2 <sup>*</sup>
GCDC	4325 $\pm$ 661	2756 $\pm$ 339	2.8 $\pm$ 0.4	22.1 $\pm$ 5.3 <sup>*</sup>
TCDC	1067 $\pm$ 217	1058 $\pm$ 191	0.4 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 1.6 <sup>*</sup>
GCA	3030 $\pm$ 600	1530 $\pm$ 269	0.4 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 1.9 <sup>*</sup>
GDCA	3643 $\pm$ 742	1152 $\pm$ 355 <sup>*</sup>	0.8 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 1.3 <sup>*</sup>
TDCA	712 $\pm$ 202	607 $\pm$ 320	0.3 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>

Pese a que la presencia de una mayor proporción de ácidos biliares conjugados con glicina en la bilis ha sido relacionado con un mayor índice de hidrofobicidad de la misma y una mayor toxicidad hepática relacionada con el desarrollo de mecanismos inflamatorios (Tagliacozzi et al., 2003; Trottier et al., 2011; Woolbright et al., 2015), la exposición a concentraciones de ácidos biliares similares a las encontradas en el suero, plasma o bilis de pacientes durante la enfermedad colestásica, resulta insuficiente para inducir toxicidad en cultivos de hepatocitos aislados (Woolbright and Jaeschke, 2016). Es probable que en el tejido, los hepatocitos no estén expuestos a los ácidos biliares de manera individualizada, sino a una mezcla de ellos. Además, como consecuencia de la ruptura del tracto biliar asociada al incremento de presión durante el desarrollo de la colestasis aguda

extrahepática, las células hepáticas podrían estar expuestas a concentraciones de ácidos biliares muy superiores a las consideradas previamente (Woolbright and Jaeschke, 2016). Por consiguiente, para estudiar el mecanismo de acción de los ácidos biliares se requiere el uso de concentraciones superiores, independientemente de que difieran de los niveles que encontramos durante la enfermedad colestática. De hecho, el empleo de GCDCA u otras sales biliares a concentraciones similares o superiores a las detectadas en el suero de pacientes colestásicos, no inducen muerte celular. En los hepatocitos humanos, los ácidos biliares resultan tóxicos a concentraciones iguales o superiores a 500 $\mu$ M, llegando a estar presentes en el medio de cultivo celular durante periodos de tiempo prolongados (Woolbright et al., 2015). Shölmerich y cols. demostraron que el empleo de CDCA en hepatocitos de rata a concentraciones iguales o superiores a 500 $\mu$ M se relaciona con la lisis de la membrana plasmática y la liberación enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) y transaminasa glutámico oxalacética (GOT) (Scholmerich et al., 1984). Otros autores, como Patel y cols., demostraron que concentraciones de GCDCA menores a 100 $\mu$ M inducen apoptosis, mientras que concentraciones superiores a 100 $\mu$ M son responsables de un fenómeno necrótico (Patel et al., 1994).

### **3.5 Efectos terapéuticos de las sales biliares**

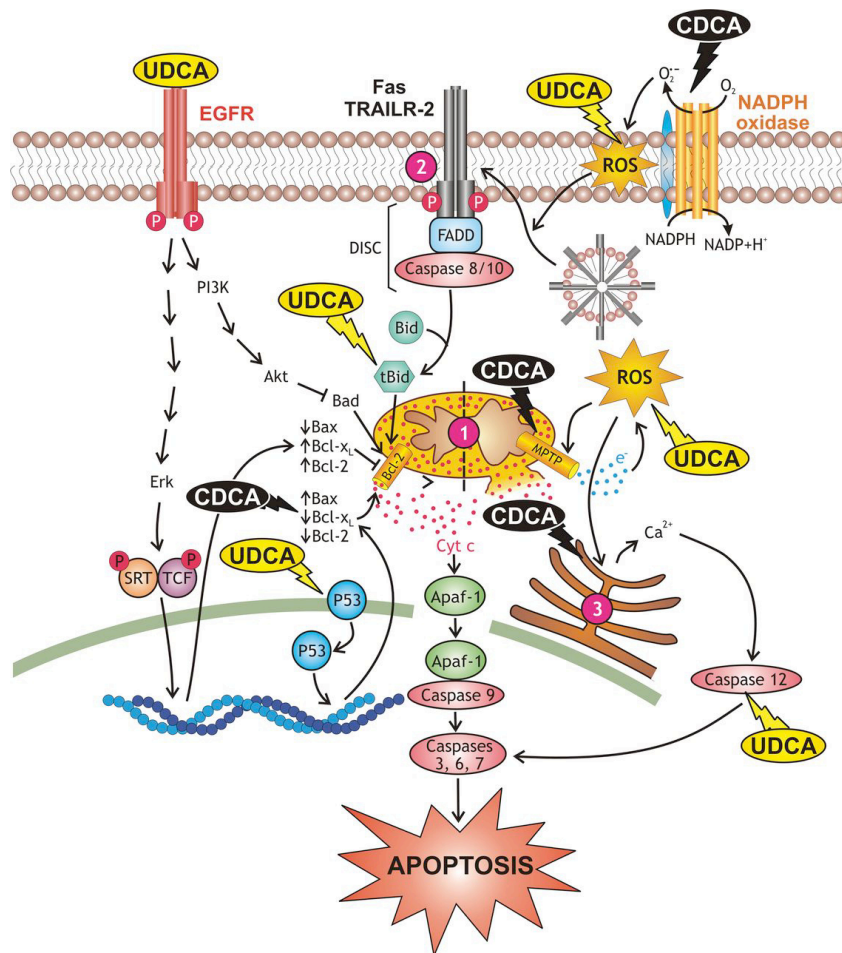
El ácido ursodesoxicólico o ácido 3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colan-24-oico (UDCA) representa más del 4% del total de ácidos biliares presentes en la bilis humana. El UDCA se origina en el colon por las bacterias intestinales a partir de la epimerización del grupo hidroxilo en la posición 7 $\beta$  del CDCA. La orientación  $\beta$  del grupo hidroxilo hace que el UDCA sea más hidrofílico que el CDCA y le confiere una menor habilidad para alterar los lípidos de membrana que la orientación  $\alpha$ -CDCA (Roma et al., 2011). Una vez sintetizado, es absorbido pasivamente por la mucosa del colon, entrando en la circulación portal para sumarse al conjunto de ácidos biliares.



Aunque el mecanismo de acción del UDCA sobre el sistema hepatobiliar no se conoce en su totalidad, se sabe que posee múltiples actividades hepatoprotectoras, tanto en su forma no conjugada como en su forma conjugada con los aminoácidos glicina (GUDCA) o taurina (TUDCA). Entre otras, cabe destacar las siguientes:

- **Inhibición de la apoptosis:** El UDCA protege a los hepatocitos y colangiocitos a través de una gran variedad de mecanismos relacionados con la preservación y estabilización de la membrana plasmática y la mitocondria (Rodrigues et al., 1998b), y mediante de la activación de vías antiapoptóticas (Rodrigues et al., 1998a) (Fig.17).

**Fig.17. Mecanismos antiapoptóticos del UDCA durante la colestasis.** Principales mecanismos de apoptosis celular inducidos por CDCA y acción protectora del UDCA. Se hace referencia a la vía apoptótica mitocondrial, la vía extrínseca y la apoptosis por estrés de retículo endoplásmico (Roma et al., 2011).



De este modo, el UDCA previene la permeabilización mitocondrial, inhibe la formación de EROs en la mitocondria y el RE, contrarresta la expresión de proteínas mitocondriales proapoptóticas (vía inhibición de p53), previene la activación de la caspasa-12 y estimula las vías de señalización antiapoptóticas ERK/SRT/TCF y PI3K/Akt mediante su unión al EGFR. Así, ERK activa la fosforilación de los factores de transcripción (FTs) SRF/TCF, que inducen la expresión de proteínas antiapoptóticas, mientras que PI3K inhibe la proteína proapoptótica Bad, vía AKT (Roma et al., 2011) (Fig.17).

- **Alteración del conjunto de ácidos biliares:** El UDCA modifica la mezcla de ácidos biliares presentes en la bilis, disminuyendo los niveles de ácidos biliares hidrofóbicos e incrementando así la proporción de ácidos biliares no tóxicos. Así, la terapia oral con UDCA disminuye los niveles de CDCA y CA a través de una menor absorción a nivel del íleon y de la estimulación de su excreción hepatocelular, siendo sustituidos por ácidos biliares hidrofílicos (Angulo, 2002).

- **Actividad inmunomoduladora:** Durante la enfermedad colestásica crónica, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II están sobreexpresados en los hepatocitos y colangiocitos. La expresión aberrante del MHC de clase I en los hepatocitos propicia su reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos. La terapia con UDCA se asocia con una menor expresión hepatobiliar del MHC de clase I y II, en pacientes con CBP (Angulo, 2002). Por otra parte, la colestasis es un factor predictivo de resistencia a interferón alfa en pacientes con virus de la hepatitis C (VCH) crónica, disminuyendo las defensas antivirales durante dicho tratamiento (Podevin et al., 1995). En pacientes con CBP, la terapia con UDCA corrige la actividad defectuosa de las células NK, inhibiendo la actividad de prostaglandina E2 (Nishigaki et al., 1996) y reduciendo la activación de los eosinófilos. Además, el tratamiento con UDCA reduce los niveles séricos de IgM, de anticuerpos antimitocondriales y de anticuerpos frente a otros componentes del CPD (Angulo, 2002).

- **Coleresis:** El UDCA presenta efectos coleréticos incrementando la excreción hepatocelular de los ácidos biliares (Angulo, 2002). Jazrawi y cols. demostraron que la terapia con UDCA mejora las tasas de excreción de los ácidos biliares en pacientes con CBP y CEP (Jazrawi et al., 1994). La secreción de  $\text{HCO}_3^-$  por los colangiocitos protege al hígado del efecto deletéreo de los ácidos biliares, incrementando sus propiedades hidrofílicas. No obstante, la expresión del intercambiador AE2, en el epitelio biliar de pacientes con CBP se encuentra disminuida. El tratamiento con UDCA incrementa su expresión, favoreciendo la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  en la bilis y protegiendo al árbol biliar de estos pacientes. En líneas celulares del conducto biliar, el UDCA incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, causando la activación de los canales de cloruro y la entrada de  $\text{HCO}_3^-$ . Por otro lado, el TUDCA induce la exocitosis vesicular dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en el dominio canalicular del hepatocito, restaurando el flujo biliar y promoviendo la excreción de los ácidos biliares hidrofóbicos al canalículo biliar (Lazaridis et al., 2001).

Actualmente, el UDCA es considerado el fármaco de elección para el tratamiento de ciertas enfermedades hepáticas colestásicas y no colestásicas. En pacientes de CBP, el UDCA mejora los test de marcadores hepáticos, retrasa el desarrollo de varices gastrointestinales, la progresión hasta cirrosis y la supervivencia a largo plazo libre de trasplante hepático. Del mismo modo, el tratamiento con UDCA provoca una mejora significativa en pacientes de CEP, CIE, colestasis inducida por nutrición parenteral, en algunas enfermedades colestasis pediátricas, fibrosis quística asociada al daño hepático, enfermedad hepática inducida por alcohol, hígado graso no alcohólico, enfermedad hepática del injerto frente al huésped y cálculos biliares (Angulo, 2002; Liver, 2009). La realización de ensayos clínicos aleatorizados confirman que la terapia con UDCA resulta ser la primera línea de tratamiento en la CIE durante el segundo y tercer trimestre de gestación (Glantz et al., 2005). Sin embargo, existen estudios

multicéntricos donde el tratamiento a largo plazo con UDCA no se relaciona con la prevención de la destrucción de los conductos biliares ni con una mejora bioquímica, histológica o virológica en pacientes que pertenecen a determinados subgrupos de CBP o con CBP avanzada, ni en pacientes con hepatitis crónica autoinmune o inducida por VHC. Del mismo modo, la monoterapia a largo plazo con UDCA no fue efectiva en 8 de 11 pacientes con síndrome combinado de CBP y hepatitis autoinmune, observándose una progresión de la fibrosis en 4 de ellos. En otro estudio multicéntrico donde participaron 150 pacientes de CEP durante cinco años, el tratamiento con elevadas dosis de UDCA (28-30mg/kg/día) tuvo que ser suspendido al acelerarse el desarrollo de varices y la necesidad de trasplante hepático. Por otro lado, se ha visto que la terapia médica con UDCA mejora los tests bioquímicos en casi el 50% de los pacientes con CIFP 3, pero no es efectivo en pacientes que padecen CIFP 1 y 2 (Jacquemin, 2001). De manera similar, el tratamiento con UDCA, en pacientes con CIRB, ha sido anecdóticamente descrito, no existiendo un tratamiento efectivo para este tipo de desorden colestásico ni para el síndrome de Alagille (Liver, 2009). Adicionalmente, existen estudios donde el tratamiento con UDCA puede aportar efectos beneficiosos en dos tercios de los casos de colestasis inducida por drogas (Lammert et al., 2000).

A pesar de sus múltiples efectos beneficiosos, de la protección y seguridad que confiere su uso, existe un considerable número de pacientes que no responden a la terapia con UDCA y presentan un mayor riesgo de progresar hacia estadios más avanzados de la enfermedad hepática. Por ello, en las últimas décadas ha sido necesario identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de nuevos fármacos seguros y efectivos para el tratamiento de los desordenes colestáticos. La terapia combinada de UDCA con las nuevas opciones terapéuticas (ácido obeticólicov, corticoesteroides, fibratos, antivirales, células mesenquimales, inhibidores del transportador apical de ácidos biliares, etc.) sigue siendo objeto de estudio en la actualidad.

A pesar de que algunas de estas terapias combinadas muestran resultados prometedores y ofrecen una mejoría respecto a la monoterapia con UDCA, también presentan efectos secundarios que obligan a su reevaluación. Actualmente, se están desarrollando ensayos clínicos aleatorizados (algunos de ellos ya en fase III) para valorar la eficacia y seguridad de estas nuevas terapias en el tratamiento de las enfermedades colestáticas (Ali et al., 2016).

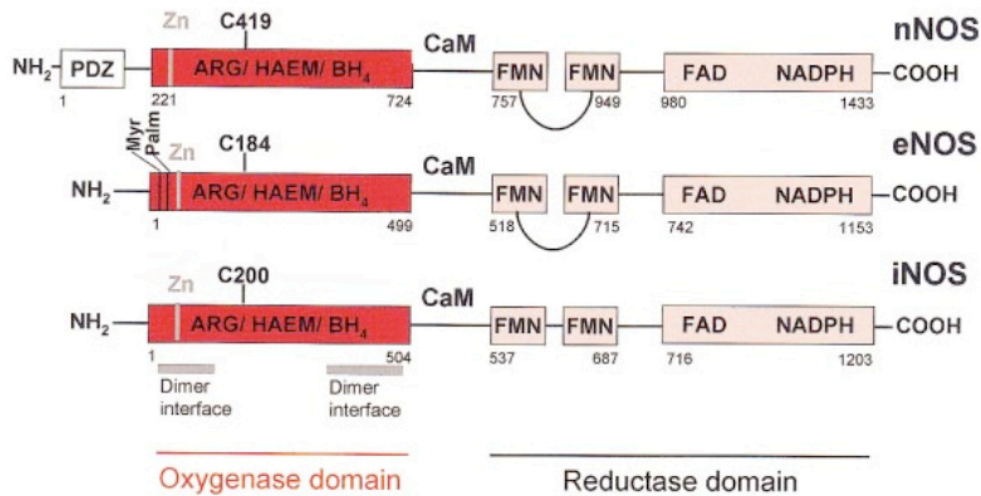
## **4. ÓXIDO NÍTRICO**

### **4.1 Generación fisiológica de especies reactivas de nitrógeno**

El óxido nítrico (ON) es un radical libre, gaseoso, lipofílico y altamente difusible, de vida media corta, que actúa como molécula de señalización regulando una gran variedad de respuestas fisiológicas como la vasodilatación, la respiración, la migración celular, la respuesta inmune o la apoptosis (Muntane et al., 2013).

El ON se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina, mediante la participación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de la NOS: la forma neuronal (NOS<sub>n</sub> o NOS-1), la inducible (NOS<sub>i</sub> o NOS-2) y la endotelial (NOS<sub>e</sub> o NOS-3). La NOS-1 y la NOS-3 se expresan de manera constitutiva y su actividad es dependiente de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Por el contrario, la expresión de la NOS-2 se induce por estímulos inflamatorios como las citoquinas, y forma un complejo activo, fuerte e irreversible con la calmodulina incluso en presencia de una baja [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Por este motivo, se considera que la actividad de la NOS-2 es independiente de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Todas las isoformas de la NOS son homodímeros (130-150KDa por monómero) y muestran un 29-39% de homología con la hemoproteína citocromo P<sub>450</sub> oxidoreductasa dependiente de NADPH (Alderton et al., 2001; Schmidt et al., 1993) (Fig.18).

**Fig.18. Dominios y sitios de unión de las isoformas NOS.** Esquema comparativo de las isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS) (Alderton et al., 2001).

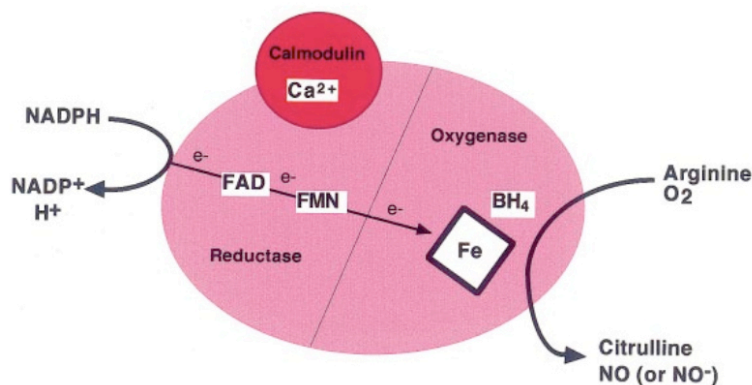


- Dominio oxigenasa: corresponde al extremo N-terminal de la proteína y contiene los sitios de unión para el grupo hemo, la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y la L-arginina. Se encuentra unido al extremo C-terminal de la proteína a través del sitio de reconocimiento de la calmodulina. La calmodulina es una pequeña proteína citosólica que presenta dos dominios globulares, capaces de unir al Ca<sup>2+</sup>. Tras la unión del Ca<sup>2+</sup>, la calmodulina experimenta un cambio de conformación, permitiendo su asociación con la proteína diana (Piazza et al., 2016).

- Dominio reductasa: corresponde al extremo C-terminal de la proteína y presenta un sitio activo para flavín mononucleótido (FMN), flavín adenina dinucleótido (FAD) y NADPH.

Durante la reacción catalizada por la NOS, los electrones son cedidos por el NADPH al dominio reductasa de la enzima y, desde este, al dominio oxigenasa a través de los transportadores redox FAD y FMN. En el dominio oxigenasa, los electrones interactúan con el grupo hemo y el BH<sub>4</sub> del sitio activo, donde catalizan la reacción del oxígeno con la L-arginina para generar citrulina y ON (Fig.19).

**Fig.19. Síntesis de óxido nítrico por la NOS.** Se indica el flujo de electrones desde el NADPH y los cofactores que participan en el proceso (Alderton et al., 2001).



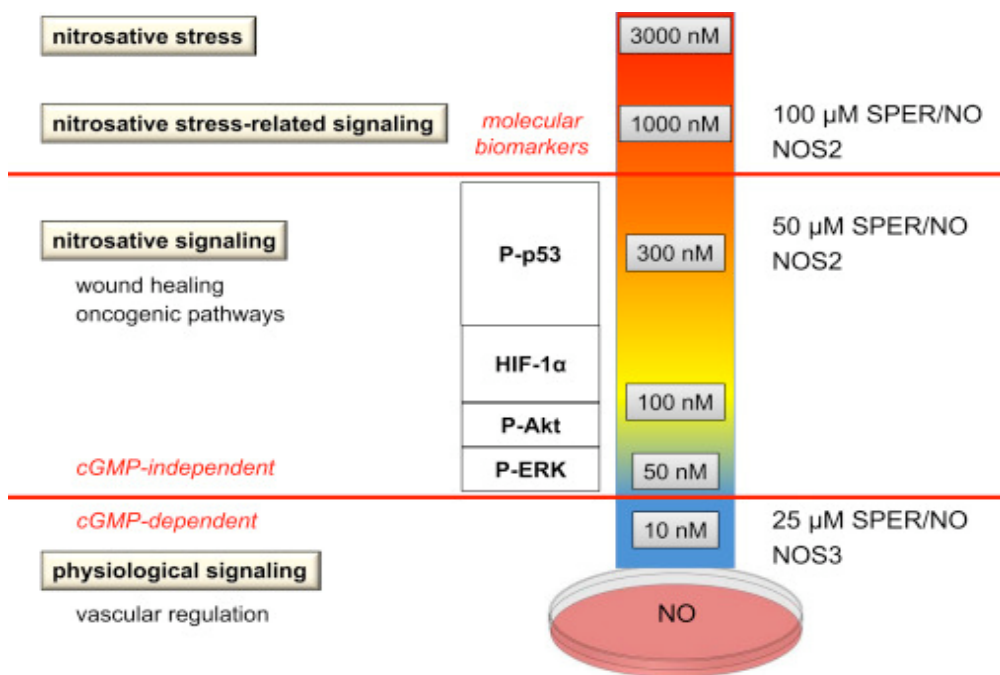
La reacción de síntesis del ON ocurre en dos pasos secuenciales que implican la hidroxilación del guanidino de nitrógeno de la L-arginina, generándose el intermediario N<sup>w</sup>-hidroxi-L-arginina (Jin et al., 2016; Stuehr et al., 2004). El BH<sub>4</sub> actúa como cofactor redox en el segundo paso de reducción y previene el desacoplamiento de la NOS y la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La unión de Ca<sup>2+</sup> a la calmodulina inicia la transferencia de electrones desde las flavinas hasta el grupo hemo, siendo por tanto necesarias ambas moléculas para la activación de la NOS. Cuando la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> aumenta, éste se une a la calmodulina y forma un complejo regulador esencial para la actividad de enzimas como la NOS-1 y NOS-3 (Stuehr et al., 2004). Debido a que la unión a la calmodulina ocurre a concentraciones ≥500nM (Schmidt et al., 1993), cuando la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es menor de 100nM, ni la NOS-1 ni la NOS-3 pueden formar el complejo con la calmodulina y, por consiguiente, son inactivas.

## 4.2 Mecanismos de acción del ON

El ON puede ejercer un efecto beneficioso o adquirir un papel potencialmente tóxico dependiendo de factores tales como su concentración, el estado fisiológico celular y el lugar donde es generado intracelularmente. Así, la exposición a concentraciones crecientes de ON se asocia con sus distintas actividades biológicas. Del mismo modo,

en presencia de estrés oxidativo y en condiciones de deficiencia del sistema antioxidante celular, el ON puede reaccionar con el  $O_2^{\cdot-}$  y generar  $ONOO^-$ , el cual es altamente reactivo y se asocia con múltiples efectos citotóxicos (Fig.20) (Schmidt and Walter, 1994).

**Fig.20. Mecanismos de acción del óxido nítrico.** Actividad biológica del ON dependiente de su concentración (Thomas et al., 2015).

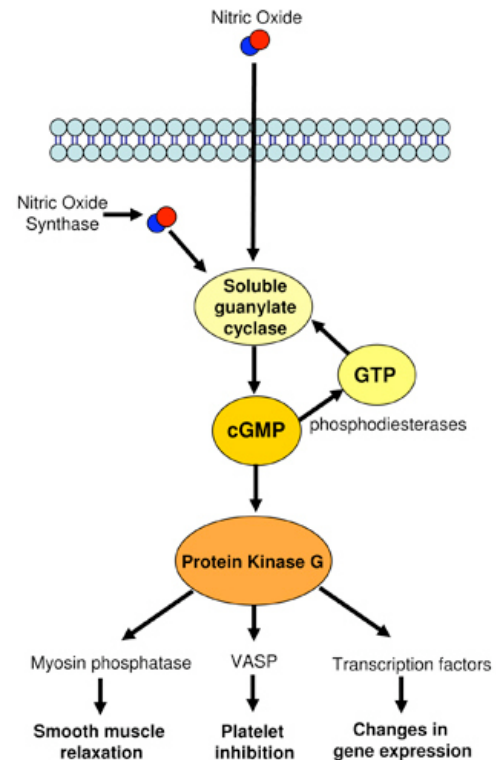


El mecanismo de acción más reconocido del ON ocurre a través de su unión a la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), activándola e incrementando así la producción de guanosín monofosfato cíclico (GMPc). El GMPc actúa como segundo mensajero, regulando una gran variedad de funciones fisiológicas (como la vasodilatación, la agregación plaquetaria y la neurotransmisión) a través de la activación de la proteína quinasa G (Fig.21) (Derbyshire and Marletta, 2012).



Otro de los mecanismos de acción del ON, este independiente de GMPc, está relacionado con la modificación postraduccionnal de las proteínas, e incluye la nitración de tirosina y la nitrosilación de los grupos tioles o S-nitrosilación de los residuos de cisteína, relacionados con la inflamación y el desarrollo de enfermedades (Franco and Estevez, 2014). Así, la nitrosilación mediada por la NOS-2 se ha relacionado con la patogénesis de varias enfermedades hepáticas, como el hepatocarcinoma y la colestasis (Lopez-Sanchez et al., 2010). Por otro lado, el ON puede actuar como un sistema de retroalimentación negativa a través de su unión al grupo hemo de la propia NOS, inhibiendo su actividad (Hurshman and Marletta, 1995).

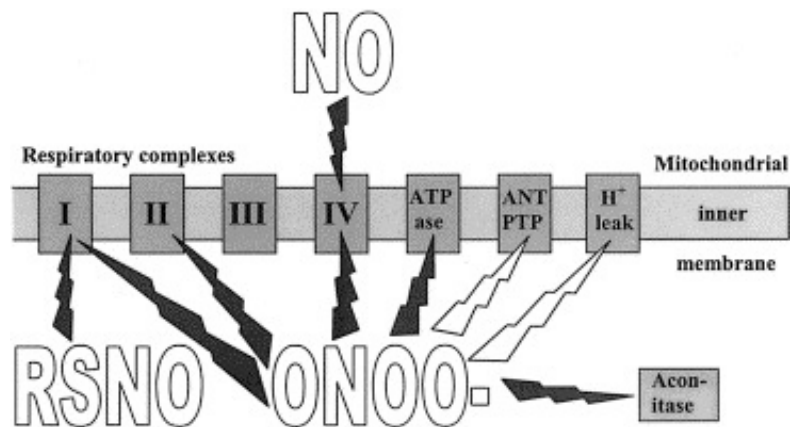
**Fig.21. Actividad fisiológica del óxido nítrico mediada por GMPc.**



El ON presenta una actividad inmunomoduladora, actuando como inductor de la apoptosis frente a las células tumorales y los tejidos vecinos. En este sentido, se ha observado que concentraciones nanomolares de ON pueden inhibir de manera reversible al CIV respiratorio mitocondrial en competición con el oxígeno. Sin embargo, concentraciones más elevadas de ON, tiempos de exposición mayores o la conversión de ON en uno de sus derivados más reactivos (peroxinitrito, dióxido de nitrógeno o nitrosotiol), provoca la inhibición irreversible de la cadena respiratoria y el daño de diferentes componentes mitocondriales a través de reacciones de oxidación. El ONOO<sup>-</sup> generado a partir de la interacción del ON con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> (acumulado como consecuencia de la inhibición de la CTE) inhibe a los

complejos mitocondriales I, II y IV, y a las enzimas ATP sintasa, aconitasa, creatina kinasa y superóxido dismutasa, y provoca daños en la membrana mitocondrial y el ADN. Esto conlleva la despolarización mitocondrial, el desacoplamiento de la CTE, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , la permeabilidad de transición mitocondrial y la muerte celular (Clemens, 1999; Giuffre et al., 1996) (Fig.22).

**Fig.22. Principales acciones del ON y sus derivados en la mitocondria.** El óxido nítrico (NO) inhibe el complejo IV de manera específica y reversible. Los nitrosotioles (RSNO) inactivan el complejo I. El peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) inhibe distintos complejos respiratorios y enzimas mitocondriales, y activa la fuga de protones y la permeabilidad mitocondrial (ANT-PTP), favoreciendo la muerte celular. Inhibición: flecha negra; Activación: flecha blanca (Brown, 2001).



Del mismo modo, el ON y el  $\text{ONOO}^-$  inducen la acumulación de p53 y, como consecuencia, la parada del ciclo celular, el incremento de la relación Bax/Bcl-xL, la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas.

Otro mecanismo independiente de GMPc utilizado por el ON para inducir apoptosis ocurre a través de la activación de la quinasa cJun N-terminal (JNK)/proteína quinasa activada por estrés (SAPK), perteneciente a la familia de las MAPKs. La formación de ceramidas induce el estímulo apoptótico, incluyendo la activación de JNK/SAPK, la liberación de citocromo c, la supresión de la expresión de Bcl-2 y la activación de las caspasas-9 y -3 (Chung et al., 2001).

Como hemos adelantado previamente, la apoptosis es un mecanismo de muerte celular característico del hígado durante los estados de inflamación. Una excesiva apoptosis puede contribuir al desarrollo de muerte celular por necrosis, mediado por la migración de neutrófilos (Jaeschke et al., 1998).

### **4.3 Oxido nítrico y daño hepático**

En el hígado se expresan las tres isoformas de la NOS, siendo las más importantes la NOS-2 y la NOS-3. La expresión de la isoforma neuronal o NOS-1 queda relegada a las terminaciones nerviosas y los vasos sanguíneos más grandes (Clemens, 1998; Esteban et al., 1997; Rockey et al., 1998). La producción de ON por la NOS-3 ocurre en pequeñas cantidades, requiriendo más tiempo (segundos) para su activación/inactivación. La NOS-3 es un importante regulador del flujo sanguíneo en el hígado (Palmer et al., 1987) y produce ON en respuesta a vasodilatadores dependientes del endotelio y a estímulos físicos como el estrés por flujo circulatorio (*shear stress*). Por ello, la desregulación de la actividad de la NOS-3 puede estar relacionada con el incremento de la resistencia vascular intrahepática durante el daño hepático. En las células endoteliales, la NOS-3, resulta necesaria para mantener la perfusión de la circulación hepática, inhibiendo la agregación plaquetaria y la acumulación de neutrófilos, atenuándose así el daño hepático (Clemens, 1999). Por otro lado, la activación de NOS-3 resulta esencial para activar la proliferación de los hepatocitos en respuesta a una hepatectomía parcial, así como para inducir la expresión de la metaloproteasa-9 (mediadora de la remodelación de la matriz extracelular) y la activación de factores de crecimiento que participan en la regeneración hepática (Mei and Thevananther, 2011).

La isoforma NOS-2 no se expresa en condiciones fisiológicas pero puede inducirse en la mayoría de las células del hígado, incluidos los hepatocitos, colangiocitos, células estrelladas, macrófagos y células endoteliales, como parte de la respuesta inflamatoria y del estrés

oxidativo. No obstante, se ha observado una expresión constitutiva de la NOS-2 en condiciones basales, asociada a la constante llegada de estímulos procedentes del tracto digestivo, vía portal (Vazquez-Gil et al., 2004). Debido a que su actividad produce grandes cantidades de ON, la expresión de NOS-2 ha sido relacionada con el desarrollo de daño hepático asociado a estrés oxidativo y la S-nitrosilación de proteínas (Clemens, 1999; Helyar et al., 1994; Rockey and Chung, 1996; Rockey et al., 1998). Así, la inhibición de su expresión o actividad en estadios patológicos se asocia con la prevención del daño hepático por isquemia/reperfusión (Acquaviva et al., 2009). Por el contrario, otros estudios atribuyen un papel citoprotector al ON derivado de la NOS-2, sugiriendo que la expresión de dicha isoforma ejerce una respuesta adaptativa para reducir el daño inflamatorio en el hígado (Taylor et al., 1998). Aunque la sobreactivación de NOS-2 fue considerada inicialmente como parte de la defensa del huésped para aumentar la capacidad citotóxica de los macrófagos, la generación de ONOO<sup>-</sup> como consecuencia de una elevada síntesis de ON resulta contraproducente para el hígado (Clemens, 1999).

Así pues, y en relación a sus mecanismos de acción, el ON desempeña diversas funciones en el hígado, adquiriendo un papel citoprotector o citotóxico en función de factores ya mencionados anteriormente, tales como su concentración, fuente que lo genera y la presencia de EROs (Tabla 4) (Clemens, 1999). Las pequeñas cantidades de ON generadas por la NOS-3 en las células endoteliales parecen ser necesarias para mantener la perfusión hepática y para conseguir los efectos antiinflamatorios y antitrombóticos necesarios. Sin embargo, la sobreexpresión de NOS-3 en células de hepatoma humano se ha relacionado con el estrés nitrooxidativo, la modificación postraducciona l de proteínas y la apoptosis (Aguilar-Melero et al., 2012). Por tanto, la expresión alterada de las isoformas de la NOS en el hígado podría actuar como un factor clave en la progresión del daño hepático crónico. Leung y cols. demostraron que la NOS-2 y la NOS-3 actúan de manera

diferente en el hígado y sugirieron que la progresión de la fibrosis es el resultado de un cambio en la expresión de ambas isoformas (Leung et al., 2008).

**Tabla 4. Factores que predisponen al daño hepático o a la protección por óxido nítrico en el hígado.**

	<b>DAÑO</b>	<b>PROTECCIÓN</b>
<b>Isoforma NOS</b>	NOS-2	NOS-2, NOS-3
<b>Tipo celular</b>	Hepatocitos, cél. de Kupffer	Hepatocitos, cél. estrelladas, cél. endoteliales
<b>Localización intracelular</b>	Mitocondrias, núcleo	Extracelular, citoplasma
<b>Nivel de EROs</b>	Alto	Bajo
<b>Función celular</b>	Formación de ONOO <sup>-</sup> , daño al ADN, incremento de la permeabilidad mitocondrial, nitrosilación	Vasodilatación, inhibición de la inflamación, adhesión celular, formación de tioles y nitrosilación de caspasa

#### **4.4 Papel del ON durante la colestasis**

Existe un número considerable de trabajos que atribuyen al ON un papel destacado durante la enfermedad hepática colestática. Entre ellos, podemos destacar los siguientes:

- Regulación negativa de la síntesis de ácidos biliares: el exceso de ácidos biliares estimula la producción de ON en los hepatocitos, promoviendo la S-nitrosilación de la proteína GAPDH y su translocación al núcleo. Allí, la GAPDH S-nitrosilada es capaz a su vez de nitrosilar a la histona deacetilasa 2 (HDAC2) para formar un complejo con el receptor nuclear SHP, reprimiendo la expresión génica de CYP7A1 (Rodríguez-Ortigosa et al., 2014).

- Inhibición de la incorporación de ácidos biliares: el ON derivado de NOS-2 es capaz de nitrosilar a la proteína transportadora de ácidos biliares NTCP, inhibiendo la incorporación de TCA en células HuH-7 transfectadas el transportador (Ramasamy et al., 2013).

- Inhibición de los mecanismos secretores de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y Cl<sup>-</sup> dependientes de AMPc: este efecto ocurre durante la inflamación, cuando las citoquinas proinflamatorias estimulan la actividad NOS-2 en el epitelio biliar, y provoca colestasis ductular propiciada por la generación de especies reactivas de nitrógeno (Spirli et al., 2003).

- Desarrollo de fibrosis portal inducida por BDL: esta afección ha sido relacionada con cambios en la producción de ON y el estado oxidativo de las células estrelladas. Vazquez-Gil y cols. demostraron que la expresión de NOS-3 (localizada en las regiones vasculares, espacios porta y venas centrolobulillares del tejido hepático) se encuentra disminuida a los 17 días de BDL e incrementada a los 31 días de la obstrucción biliar (Vazquez-Gil et al., 2004). Por el contrario, Zimmermann y cols. observaron una disminución de la producción de nitratos/nitritos y de la expresión de NOS-3 (pero no de NOS-2) en hepatocitos de rata durante la cirrosis biliar inducida tras BDL. Este efecto revirtió tras la cirugía de descompresión del conducto biliar (Zimmermann et al., 1996).

- Desarrollo de hipertensión portal: el aumento de presión sanguínea en la vena porta durante la colestasis ha sido relacionado con la sobreexpresión de caveolina-1. Esta proteína es un componente de las caveolas (pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática), capaz de unirse a la NOS-3 e inhibir su actividad, disminuyendo la disponibilidad hepática de ON y alterando las respuestas vasodilatadoras (Shah et al., 2001).

Como consecuencia del papel que ejerce el ON durante la colestasis, ha sido descrito el efecto beneficioso de ciertos compuestos capaces de incrementar la actividad NOS o la disponibilidad de ON durante la enfermedad hepática:

- AVE 9488: es un compuesto farmacológico perteneciente al grupo de los denominados “potenciadores de NOS-3”, capaz de disminuir la presión y la resistencia vascular portal durante la cirrosis biliar secundaria en animales sometidos a BDL, a través del incremento de la expresión de NOS-3 (Biecker et al., 2008).

- NCX-1000: pertenece a la familia de compuestos “liberadores de ON” derivados del UDCA. Este compuesto ha sido generado por la adición de una molécula liberadora de ON al UDCA, y posee la propiedad de liberar selectivamente cantidades significativas de ON en el hígado, compensando así la producción defectuosa que pudiera existir durante el desarrollo de la enfermedad hepática (Fiorucci et al., 2001b). La administración de NCX-1000 se ha relacionado con una potente actividad antiapoptótica (Fiorucci et al., 2001b) y la reducción de la resistencia intrahepática (Fiorucci et al., 2001a), en modelos celulares y modelos animales de daño hepático, respectivamente. Estudios en fase I con voluntarios sanos, tratados con una única dosis de NCX-1000 de hasta 3g y con dosis múltiples de hasta 2g durante siete días, indican que no existen problemas de seguridad y tolerancia durante la administración del fármaco. Sin embargo, en un estudio de doble ciego aleatorizado que incluyó pacientes con cirrosis e hipertensión portal, el NCX-1000 falló en reducir la presión portal. Aunque volvió a demostrar ser segura, la administración de NCX-1000 causó una reducción de la presión sistólica y el flujo sanguíneo hepático. Esto sugiere que el NCX-1000 produce un efecto sistémico, el cual no se corresponde con su supuesta capacidad de liberar ON en la circulación intrahepática de manera selectiva (Berzigotti et al., 2010).

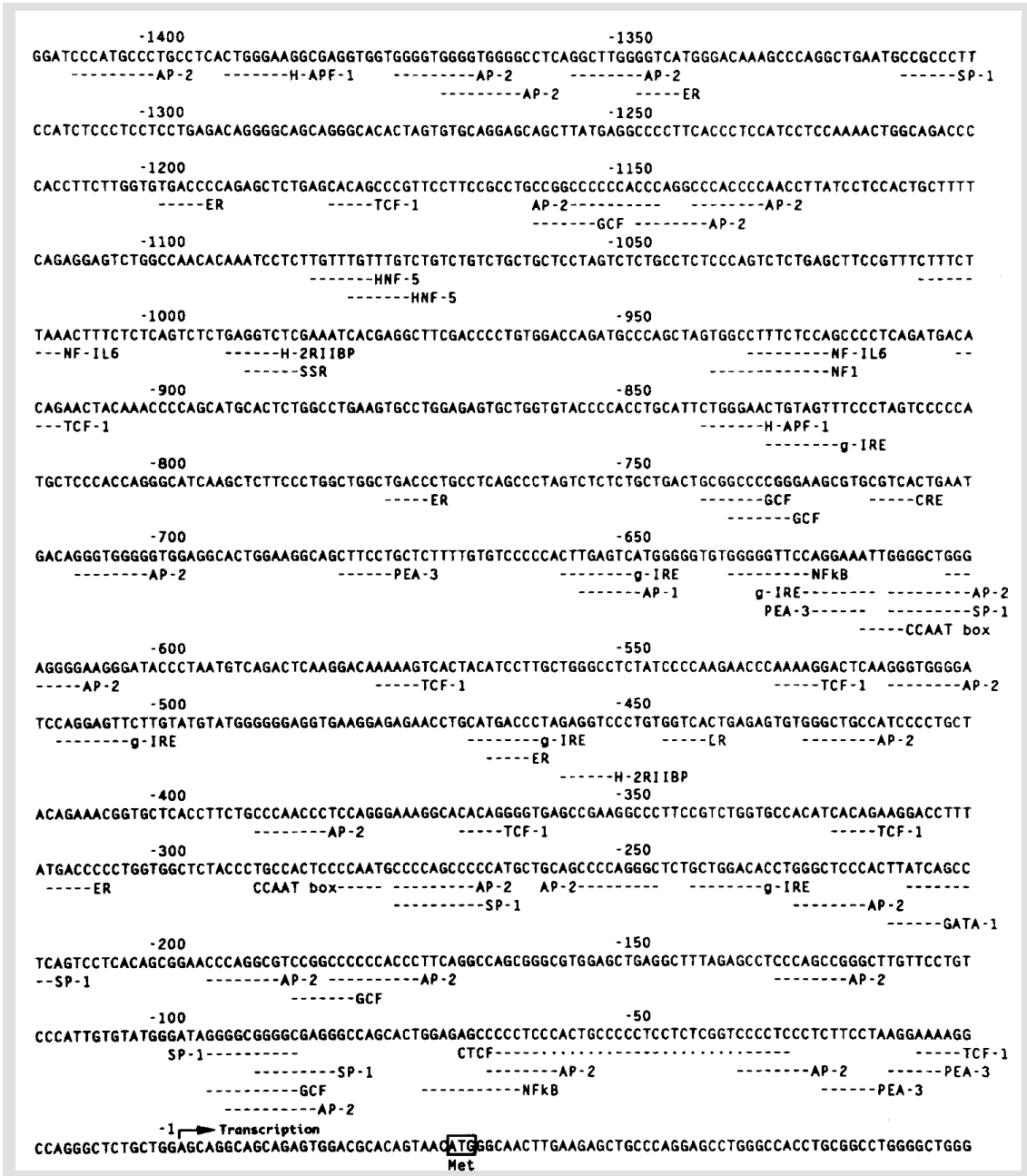
## 4.5 Caracterización del promotor de NOS-3

El gen humano de la NOS-3 está localizado en la región 7q35-7q36 del cromosoma 7, tiene una longitud de 21Kb de ADN genómico y está formado por 26 exones. El ARNm tiene un tamaño de 4,1Kb y la proteína está constituida por 1.203 aminoácidos.

Estudios de caracterización molecular de la región promotora de NOS-3 (pNOS-3) revelan que la región flanqueante 5' carece de caja TATA pero contiene dos cajas CCAAT, presentando además secuencias consenso para la unión de FTs. El pNOS-3 tiene una longitud de 11Kb aproximadamente, y contiene seis regiones muy ricas en guanina y citosina que corresponden a putativos sitios de unión para el FT Sp1 (o proteína específica 1), un elemento de respuesta a estrés y 5 sitios de unión para el FT GATA, perteneciente a la familia de FTs en dedos de zinc. Contiene, además, seis elementos de unión a receptores estrogénicos, relacionados con la inducción de la expresión de NOS-3 en presencia de dichas hormonas, y seis regiones putativas de respuesta a citoquinas, a los que se unen FTs tales como H-APE1, NF-IL6 y NFκB. Adicionalmente, el promotor de la NOS-3 presenta dos sitios de unión para AP-1 (o proteína activadora 1), varios para AP-2, dos para el elemento NF-1, cuatro para PEA-3, dos regiones para la unión de elementos invertidos en fase aguda, una secuencia consenso para la unión de elementos de respuesta a AMPc, dos elementos de respuesta a esterol y seis para el FT MAZ (o myc asociado a dedos de zinc) (Fig.23) (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999; Marsden et al., 1993; Miyahara et al., 1994).



**Fig.23. Sitios de unión para factores de transcripción en el promotor de NOS-3.** Se muestra un fragmento de 1.415pb del promotor (Miyahara y cols., 1994).



En esta tesis doctoral, la participación de los FTs, Sp1 y AP-1 ha sido valorada en la regulación de la expresión de NOS-3 mediante el uso de inhibidores específicos. A continuación se describe la naturaleza química de los mismos así como su mecanismo de acción:

## **Inhibidores de Sp1**

- **Mitramicina A (MitA)** es un antibiótico antitumoral, conocido como ácido aureólico tipo poliquétido, producido por varios tipos de bacterias del suelo *Streptomyces*, que se une específicamente a regiones no covalentes del ADN ricas en GC, localizadas en el surco menor del ADN, inhibiendo la expresión y la actividad de miembros de la familia del FT de Sp, por desplazamiento del FT de sus sitios de unión en el promotor de numerosos genes (Jia et al., 2010). No obstante, Sleiman y cols. demostraron que la MitA no es capaz de desplazar a algunos miembros de la familia de FTs Sp de algunos promotores génicos en neuronas. Sus investigaciones sugirieron que la MitA podría interaccionar con el ADN de una manera que permita selectivamente desplazar a Sp de algunos sitios de unión y no de otros, o que secuencias adyacentes a los sitios de unión de Sp jueguen un papel importante en la capacidad de la MitA para desplazar a Sp. Así, recientes trabajos han demostrado que la MitA inhibe la unión de Sp1 a los promotores de genes asociados con el cáncer y por el contrario, ignoran la unión de Sp1 a sus sitios diana en genes relacionados con la supresión de tumores, como p21 (Sleiman et al., 2011). En otros trabajos se ha demostrado que la MitA inhibe la expresión de Sp1 a través de una competencia directa con el reclutamiento de Sp1 a los sitios de unión presentes en su propio promotor (Jia et al., 2010). La MitA ha sido ampliamente estudiada, pudiendo participar en la inhibición de la apoptosis (Nunez et al., 2012), o emplearse como agente quimioterápico con potencial terapéutico para tratamiento de muchos tipos de cánceres, al unirse competitivamente en el promotor de los oncogenes Myc (Snyder et al., 1991) y c-Scr (Remsing et al., 2003), inhibiendo su transcripción. De hecho, la MitA está clínicamente aprobada para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y del cáncer testicular, además de cómo terapia frente a la hipercalcemia (Brown and Kennedy, 1965; Collin et al., 1989; Koller and Miller, 1986). Por otro lado, Sleiman y cols. observaron que el empleo de MitA

prolongó la supervivencia de ratones con enfermedad de Huntington's, al inhibir la muerte celular inducida por estrés oxidativo en neuronas corticales, demostrándose también su eficacia frente a enfermedades neurológicas (Sleiman et al., 2011).

- **Ácido tolfenámico (AT)** es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), potente inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas y de leucotrienos, empleado en el tratamiento de las migrañas. Además le ha sido atribuido un papel antitumoral siendo por ello utilizado en multitud de ensayos, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Abdelrahim et al., 2006; Eslin et al., 2013; Konduri et al., 2009; Sankpal et al., 2012). El AT facilita la degradación por el proteosoma de los miembros de la familia de los FTs SP, inhibiendo su actividad (Jia et al., 2010), lo que le permite modular la expresión de genes involucrados en la regulación de la apoptosis, el ciclo celular, la angiogénesis y crecimiento celular (Konduri et al., 2009).

### **Inhibidores de AP-1**

- **Curcumina** es un pigmento amarillo obtenido de la planta *Curcuma longa*, que posee efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antisépticos (Huang et al., 1997b; Lam et al., 2016; Lee et al., 2016), y es conocido como inhibidor de AP-1 al participar en la reducción de su actividad (Liang et al., 2015), disminuyendo la expresión de cJun y de cFos, en diversos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Lu et al., 1994). Además se ha investigado su papel como agente quimiopreventivo participando en el retraso o supresión de la carcinogénesis (Duvoix et al., 2005). Trabajos publicados recientemente han demostrado que la curcumina podría ser un excelente candidato para el tratamiento de la enfermedad colestásica. Así, la inhibición del complejo AP-1 por curcumina, inhibió la actividad caspasa 3/7 por GCDCA y por TLCA, a través del bloqueo de las proteínas de la vía MAPKs en células HepG2-Ntcp (Bernt et al., 2006; Pusl et al., 2008). En otros estudios, el tratamiento con curcumina mejoró los daños

inducidos por alfa-naftilisotiocianato en ratones, a través de la activación de FXR, empleado como sensor de los ácidos biliares y de la restauración de la expresión de los sistemas de excreción de ácidos biliares como BSEP, MRP4 y OATP, inhibiendo además la expresión de genes relacionados con la inflamación, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y NOS-2 (Yang et al., 2016). En otros trabajos, la administración de curcumina durante 14 días a ratas BDL recuperó la función hepática y disminuyó el daño en el ADN y el proceso inflamatorio, a través de una reducción de TNF- $\alpha$ . Por otro lado la curcumina como molécula antioxidante, redujo el estrés oxidativo, aumentando la actividad de las enzimas antioxidantes y minimizó la peroxidación lipídica. Además, curcumina redujo la producción de ON sintetizado por la NOS-2, implicado con la formación de peroxinitritos, los cuales están involucrados en el proceso apoptótico (Tokac et al., 2013). Reyes-Gordillo y cols. atribuyeron el efecto protector de la curcumina a su capacidad de reducir la expresión del factor de crecimiento transformante beta TGF- $\beta$ , asociado con la inducción de la expresión de proteínas que contribuyen con el desarrollo de matriz y por tanto con el desarrollo de fibrosis hepática (Reyes-Gordillo et al., 2008). Sin embargo, en otras investigaciones el tratamiento con curcumina en ratas BDL, no redujo el desarrollo de fibrosis hepática a pesar de mejorar los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina, AST, proteínas totales, albúmina, globulina, bilirrubina total y directa y urea (Barta et al., 2015).

- **Quercetina** es un flavonoide presente en una gran variedad de plantas. Participa en una gran variedad de funciones biológicas como la modulación del estrés oxidativo y el proceso antiinflamatorio, la inducción de daño en el ADN de células cancerígenas, y presenta propiedades antivirales. Ejerce un papel protector frente a la patogénesis de múltiples enfermedades relacionadas con la generación de estrés oxidativo como el cáncer, la enfermedad coronaria y la aterosclerosis, por lo que es considerado como un agente terapéutico. La quercetina protege frente al daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células

humanas Caco-2, aumentando los mecanismos de reparación del ADN a través de la modulación de las enzimas de reparación del ADN. Su capacidad antioxidante se ha relacionado con una disminución de la actividad caspasa-3 y de LDH (Alia et al., 2006; Vazhappilly, 2016). Además, la quercetina inhibe la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la inhibición del complejo de AP-1 formado por cJun y cFos (Ishikawa and Kitamura, 2000). Presenta efectos beneficiosos frente a diversos tipos de daño hepático. Así la suplementación dietética con quercetina presentó efectos beneficiosos frente al daño hepático inducido por aflatoxina B1, tioacetamida, etanol, paracetamol, CCl<sub>4</sub> y mejoró la cirrosis y sus complicaciones en diversos modelos animales (Bharrhan et al., 2012; Choi et al., 2010; de David et al., 2011; Domitrovic et al., 2012; Vieira et al., 2011; Yousef et al., 2010). La administración oral de quercetina a ratas BDL atenuó los niveles séricos de AST, ALT, GGT y bilirrubina total y los parámetros de inflamación, TGF-β1 e IL-1β. Además quercetina presentó efectos antifibróticos acompañados por una reducción de los depósitos de colágeno, redujo la proliferación ductular y disminuyó el estrés oxidativo, previniendo el incremento de la GSSG/GSH y restableció la actividad de las enzimas antioxidantes (Lin et al., 2014; Peres et al., 2000). Por tanto se ha visto, que el empleo de quercetina podría ser útil para la preservación de las funciones hepáticas en pacientes con obstrucción biliar.

- **Retinoides** lo constituyen un grupo de análogos de la vitamina A, sintéticos y naturales, que pueden regular numerosos procesos biológicos incluyendo la diferenciación, la morfogénesis, la proliferación celular y la homeostasis. Han sido empleados con éxito en el tratamiento de la psoriasis, acné, y desórdenes cutáneos. Presentan efectos antiinflamatorios, inhibiendo la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β e IL-6 en varios tipos celulares. Son además considerados potentes agentes antitumorales al ser capaces de inhibir el crecimiento celular del tumor e inducir la diferenciación de ciertas células malignas, causando la reversión fenotípica de las

mismas. Estudios clínicos han demostrado que los ácidos retinoicos son efectivos para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, sin embargo su uso clínico es limitado debido a los diversos efectos secundarios que presentan los pacientes, tales como alteraciones en el sistema nervioso central, incluyendo mareos, dolor de cabeza, letargo y alteraciones visuales, entre otros. (Montrone et al., 2009). Además son conocidos por sus propiedades teratógenas, estando contraindicado su uso durante el embarazo (Huang et al., 1997a). Los ácidos retinoicos actúan como mensajeros intracelulares, ejerciendo sus efectos pleiotrópicos a través de dos clases de receptores nucleares, específicos y diméricos, que actúan como factores de transcripción. La actividad biológica de los retinoides está mediada por la activación transcripcional de los elementos de respuesta de ácidos retinoicos (RARE) y la inhibición de la actividad AP-1, al combinarse con los dos posibles tipos de receptores: los receptores de ácido retinoico clásicos (RARs) cuyos miembros son RAR $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$ , y el receptor X retinoide (RXRs) también formado por el RXR $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$ , generados por splicing alternativo. Ambos tipos de receptores pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales tiroideos/esteroideos. Pueden formar homodímeros o heterodímeros y difieren entre sí en la estructura primaria y en la respuesta frente a los ácidos retinoicos (Fanjul et al., 1994; Pfahl et al., 1994), funcionando como factores reguladores de la transcripción inducidos por ligando. Diversos trabajos han demostrado que RARs y RXRs pueden actuar como transrepretores de la actividad del complejo AP-1 (cJun y cFos), dependientes de ligando y recíprocamente, que AP-1 puede inhibir la transactivación de RARE inducida por RARs y RXRs (Chen et al., 1995). Aunque ambos tipos de receptores pueden activar de manera directa a RARE e inhibir la actividad de AP-1, diversas líneas de investigación han sugerido que algunos retinoides sintéticos son selectivos, participando o en la transactivación de RARE, o bien sobre la actividad anti-AP-1, a través de su unión a los receptores nucleares (Fanjul et al., 1994). El empleo en la práctica clínica de los retinoides se ha visto

limitado al no presentar un perfil de seguridad aceptable, atribuyéndose este fenómeno a la activación transcripcional de RARE. Por tanto, una clase interesante de retinoides son aquellos que presentan efectos antagonísticos frente a AP-1, pero no efectos sobre la transactivación transcripcional de RARE. Afortunadamente en la actualidad se ha llevado a cabo el diseño de retinoides sintéticos, caracterizados por ser transcripcionalmente inactivos aunque conservan sus propiedades antiproliferativas, atribuidas a la inhibición de la actividad AP-1. Estas moléculas han sido propuestas como agentes terapéuticos, al presentar efectos secundarios reducidos (Fanjul et al., 1994; Li et al., 1996). La habilidad de estas moléculas de inhibir la actividad de AP-1 los hace clínicamente útiles frente al tratamiento de diversos tipos de enfermedades como la artritis reumatoide, la psoriasis y el cáncer, debido a que estas patologías destacan por inducir la expresión génica de metaloproteasas y citoquinas, dependientes de la unión de AP-1 a sus promotores génicos. En relación a la actividad antitumoral que presentan los retinoides, únicamente la transrepresión de AP-1 pero no la transactivación de RARE, parece estar relacionada con su actividad antitumoral (Huang et al., 1997a; Li et al., 1996; Pfahl et al., 1994). De hecho, estudios previos han sugerido la importancia de la activación de AP-1 en la transformación celular, siendo requerida para la progresión de las células epidérmicas de ratón JB6 RT101, desde un estadio preneoplásico hasta uno neoplásico (Dong et al., 1995). La sobreexpresión de cJun en células JB6 se ha relacionado con la transformación neoplásica, por lo que el empleo de un mutante negativo para cJun, bloqueó la progresión del tumor (Dong et al., 1994). Afortunadamente en la actualidad se ha descrito la existencia de retinoides sintéticos capaces de inhibir la actividad de AP-1 sin activar la transcripción de RARE (Fanjul et al., 1994; Li et al., 1996). Estas moléculas han sido previamente propuestas como agentes terapéuticos, al desarrollar unos efectos secundarios mínimos. Entre ellos, se encuentran los retinoides SR11220, el SR11238 que pese a presentar

una pequeña activación transcripcional de RARE (del 20% y del 10% respectivamente), conservan su efecto antiproliferativo, debido a la capacidad que presentan de inhibir la actividad de AP-1. Otro grupo de retinoides es el compuesto por los derivados sintéticos BMS411 y BMS453, capaces de antagonizar con AP-1 a través de su unión con los tres tipos de RARs. Por último, el AGN190168 y el AGN190299 que aunque son moléculas transcripcionalmente inactivas, al unirse a RAR- $\alpha$ , tampoco son capaces de inhibir la expresión génica dependiente de AP-1 a través de este receptor (Jones and Petkovich, 1996). SR11302 pertenece a esta nueva clase de retinoides sintéticos formada por moléculas transcripcionalmente inactivas que han perdido los efectos diferenciadores de los ácidos retinoicos, al no poder activar a RARE, pero conservando al mismo tiempo su capacidad antiproliferativa, relacionada con la inhibición de la actividad de AP-1. Esta molécula ha sido previamente estudiada como posible tratamiento de diversas patologías humanas como la inflamación peritoneal (Catar et al., 2013) y el cáncer (Huang et al., 1997a; Li et al., 1996). Así, investigaciones realizadas por Fanjul y cols. donde se evaluó la activación transcripcional de RARE y la actividad anti AP-1 de distintos retinoides sintéticos, revelaron que el retinoide SR11302 es una molécula transcripcionalmente inactiva, siendo por tanto incapaz de activar a RARE pero con una fuerte actividad anti AP-1, superior al 81%, a través de su unión a los receptores RAR $\alpha$  y  $-\gamma$ , pero no  $\beta$  y a RXR $\alpha$  y  $-\beta$  pero no  $\gamma$  (Fanjul et al., 1994).



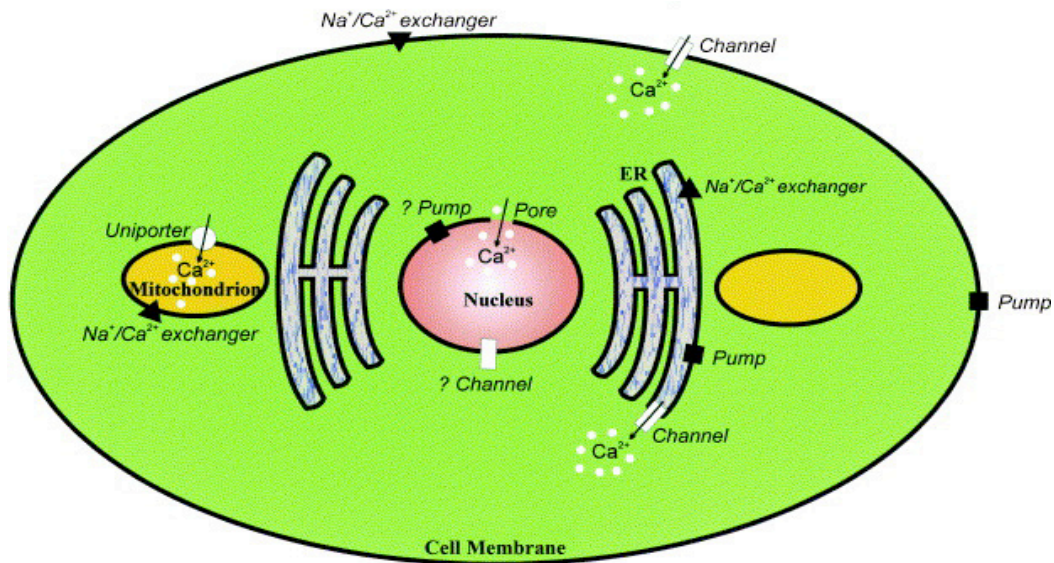
## 5. CALCIO

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un catión con capacidad multifuncional como segundo mensajero en diferentes tipos celulares. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son enviadas a través de los canales y participan como potentes reguladores de numerosos aspectos del metabolismo celular, incluyendo el control del crecimiento, la división, la motilidad, la secreción, la transformación tumorigénica y la contracción muscular (Marchi and Pinton, 2016). Además, cabe destacar que el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como cofactor de enzimas tales como proteasas, fosfolipasas y endonucleasas, siendo el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  un factor directamente relacionado con la muerte celular (Orrenius, 1988). Por tanto, defectos en la ruta de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  han sido frecuentemente relacionados con numerosas enfermedades humanas. La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se mantiene gracias a la existencia de un gradiente de concentración entre el medio extracelular, donde el rango de concentración se encuentra dentro del nivel milimolar, y el medio intracelular, donde la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en el citosol se sitúa entre 0,1-0,4 $\mu\text{M}$ . Dicho gradiente, acoplado a un gradiente electroquímico, sirve como una fuerza conductora que permite su transporte al interior celular. El mantenimiento de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  resulta fundamental para poder mantener una baja  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ya que alteraciones en los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  puede tener efectos negativos para la célula. Esto se consigue a través de la compartimentalización intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  y de su salida al medio extracelular (Reed et al., 1990).

### 5.1 Sistemas de transporte de calcio

Los sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula los hemos agrupado distinguiendo entre los que regulan la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citoplasmática, mitocondrial o nuclear, considerando tanto sistemas de importe como de exporte. En la Fig.24 se esquematizan los principales sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  celulares.

**Fig.24. Sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula** (Ermak and Davies, 2002).



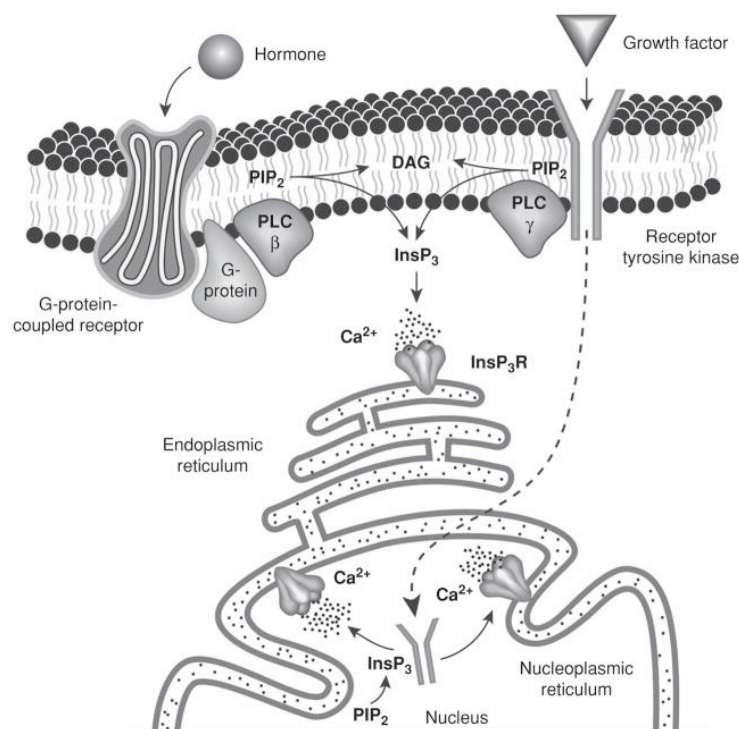
### 5.1.1 Transporte de calcio en el citoplasma

La  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el citoplasma está regulada a través del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro y fuera de los lugares de almacenaje intracelular (RE y retículo sarcoplásmico o RS), así como por su transporte a través de la membrana plasmática (transporte intercelular y extracelular). Mientras que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula ocurre a través de varios canales, como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor y por segundos mensajeros, su salida depende de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  e intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . No obstante, ante determinadas circunstancias (p.ej. condiciones de estrés), el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  puede quedar interrumpido (Berridge and Irvine, 1989).

El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el RE/RS y el citoplasma está regulado por los siguientes canales y bombas (Ermak and Davies, 2002):

- **ATP-asa transportadora de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE/RS (SERCA):** es una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP, que funciona transportando el  $\text{Ca}^{2+}$  al lumen del retículo, en contra del gradiente de concentración (Marin et al., 1999).

- **Canales operados por inositol 1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>):** son los responsables de la movilización del Ca<sup>2+</sup> almacenado en los compartimentos intracelulares, a través de la unión de InsP<sub>3</sub> al receptor IP<sub>3</sub>R localizado en la superficie del RE/RS (Ermak and Davies, 2002). El mecanismo de liberación se inicia tras la unión de hormonas o factores de crecimiento a receptores acoplados a proteína G (GPCRs) o receptores tirosina quinasa (RTKs), respectivamente, localizados en la superficie de la membrana plasmática. A continuación, ocurre la activación de la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza al fosfolípido de membrana plasmática fosfatidilinositol-4-5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para generar diacilglicerol (DAG) e InsP<sub>3</sub>. Mientras que el DAG permanece en la membrana plasmática para activar a la proteína quinasa C (PKC), el InsP<sub>3</sub> difunde por el citoplasma para unirse al IP<sub>3</sub>R y favorecer la liberación de Ca<sup>2+</sup>. Alternativamente, el RTK puede translocarse al núcleo, donde activa localmente a la PLC e induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde retículo nucleoplásmico hacia el nucleoplasma (Fig.25) (Amaya and Nathanson, 2013).



**Fig.25. Mecanismo de liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular mediado por receptores acoplados a proteína G y receptores tirosina quinasa** (Amaya and Nathanson, 2013).

- **Canales activados por receptores de rianodina (RyRs):** son canales característicos de células excitables, como las musculares y las neuronas, aunque también han sido descritos en hepatocitos (Amaya and Nathanson, 2013). Estos canales liberan  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a través de un mecanismo conocido como “liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ”. En presencia de bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, las moléculas de rianodina mantienen abierto estos canales, favoreciendo su liberación (Tran et al., 2000).

### **5.1.2 Transporte de calcio a la mitocondria**

La  $[\text{Ca}^{2+}]$  mitocondrial es dependiente de la citoplasmática, la cual depende del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el RE/RS y la membrana plasmática (Ermak and Davies, 2002). El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria ocurre a través de uniportadores, actuando como canales que se abren cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el citoplasma aumenta (Rizzuto et al., 2000). De modo inverso, el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria hasta el citoplasma ocurre a través de intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Fig.24). Adicionalmente, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede liberarse de la mitocondria en grandes cantidades a través de la permeabilidad del poro de transición, un canal que requiere de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial para propiciar su apertura (Bernardi, 1999).

### **5.1.3 Transporte de calcio al núcleo**

En el núcleo, la presencia de poros permite el flujo libre de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el núcleo depende de la del citoplasma. Sin embargo, algunos estudios demuestran que la envoltura nuclear puede actuar como un filtro para el  $\text{Ca}^{2+}$ , presentado bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  y canales operados por  $\text{InsP}_3$  y ADP ribosa (Santella and Carafoli, 1997) (Fig.24).

## 5.2 El calcio en el hígado

La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  está regulada por un doble proceso: su salida activa al medio extracelular y su almacenamiento en los compartimentos celulares. De esta forma, se mantiene una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de 100-200nM en condiciones fisiológicas (Carafoli, 1987). En el hígado, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  contribuye en la regulación de una amplia variedad de funciones, entre las que cabe destacar las siguientes (Exton, 1988; Pusch and Nathanson, 2004):

- **Secreción biliar:** este proceso depende del funcionamiento de los sistemas de transporte en los hepatocitos y colangiocitos y de la integridad del sistema de secreción biliar (Nathanson and Boyer, 1991), que se encuentra regulado por  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, el empleo de agentes que incrementan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (bien favoreciendo su entrada desde el medio extracelular, bien fomentando su salida desde los compartimentos intracelulares) ha sido relacionado con la inhibición de la secreción biliar en hígados perfundidos (Nathanson et al., 1992a), al favorecer el reflujo de la bilis al espacio sinusoidal, quedando de este modo disipado el gradiente osmótico que impulsa el flujo biliar (Nathanson et al., 1992b). Por el contrario, existen trabajos que relacionan el  $\text{Ca}^{2+}$  con la secreción de aniones orgánicos a la bilis, a través del transportador MRP2 de la membrana canalicular de los hepatocitos (Cruz et al., 2010). Adicionalmente, el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel importante en el mantenimiento de la secreción de las sales biliares a través de la bomba BSEP. El papel que desempeña el  $\text{Ca}^{2+}$  en la secreción canalicular del hepatocito ha sido relacionado con la regulación de la exocitosis vesicular en el hígado (Bruck et al., 1994). Por otro lado, el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como consecuencia de su liberación de los reservorios del RE a través de los canales operados por  $\text{InsP}_3$  (Hirata et al., 2002b), participa en la contracción canalicular necesaria para conducir el flujo biliar hacia el sistema canalicular y el conducto biliar (Amaya and Nathanson, 2013). Además de esto, el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la activación de

los canales de cloruro presentes en la membrana apical de los hepatocitos, necesarios para el intercambio con el  $\text{HCO}_3^-$ , a través del intercambiador AE2 (Kanno et al., 2001).

- **Metabolismo de la glucosa:** el  $\text{Ca}^{2+}$  modula los procesos de fosforilación/desfosforilación de enzimas intracelulares que participan en el metabolismo de la glucosa, como la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa, los cuales se relacionan con la regulación de su actividad (Amaya and Nathanson, 2013).

- **Proliferación celular:** el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la progresión del ciclo celular (Kahl and Means, 2003) (Whitaker, 2006) y la proliferación celular (Steinhardt and Alderton, 1988). La translocación al núcleo de ciertos factores de crecimiento, como la insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de hepatocito (HGF), estimulan la proliferación de los hepatocitos a través de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante los canales operados por  $\text{InsP}_3$  (Gomes et al., 2008; Rodrigues et al., 2008). Además, las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear han sido relacionadas con la activación de FTs que participan en la estimulación de la proliferación celular (Andrade et al., 2011).

- **Apoptosis:** este mecanismo de muerte celular está regulado por una gran variedad de proteínas y, en parte, por mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por  $\text{InsP}_3\text{R}$  (Madesh et al., 2005). En concreto, la vía apoptótica mitocondrial se encuentra inhibida por miembros de la familia de Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1. Mientras que uno de los mecanismos a través de los que Bcl-2 ejerce su efecto inhibitorio es la disminución de los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (Bassik et al., 2004), Bcl-xL actúa inhibiendo la expresión del  $\text{InsP}_3\text{R}$  (Li et al., 2002). De este modo, se reduce la liberación citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE, disminuye la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  capaz de ser transferida a la mitocondria y, como consecuencia, decae la susceptibilidad a la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP), reduciéndose así el estímulo apoptótico (Li et al., 2002). Por el contrario, los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y

Bak, favorecen la liberación de cantidades tóxicas de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma a través de la fosforilación del  $\text{InsP}_3\text{R}$  (Oakes et al., 2005) y la liberación de citocromo c. La inhibición de la interacción entre el citocromo c y el  $\text{InsP}_3\text{R}$  inhibe el proceso apoptótico (Boehning et al., 2003).

- **Estado redox mitocondrial:** la permeabilidad mitocondrial y la muerte celular pueden estar inducidas por la generación incontrolada de EROs, asociada a alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . La presencia de oxidantes incrementan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  al estimular los  $\text{InsP}_3\text{R}$  del RE e inhibir la bomba de SERCA, así como la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales presentes en la membrana plasmática (Camello-Almaraz et al., 2006). A su vez, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria estimula el metabolismo oxidativo, aumentando la producción de ATP y, como consecuencia, la generación de radicales libres como subproducto de la fosforilación oxidativa. Este hecho se asocia con la apertura del PTP y la muerte celular (Peng and Jou, 2010). La fosfoproteína NS5A del virus de la hepatitis C (VCH) se asocia con la inducción de estrés oxidativo y la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, reduciendo su acumulación en los compartimentos intracelulares y en consecuencia, aumentando en el citosol. De manera similar, la transfección de células HepG2 con las proteínas del núcleo del VCH, implicadas en la oncogénesis hepática, se asocia con una disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el RE (Dionisio et al., 2009). No obstante, el estrés oxidativo se ha relacionado también con una reducción del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , disminuyendo su concentración en el citoplasma. Así, la incubación de hepatocitos aislados de rata en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se ha relacionado con la generación de estrés oxidativo y con la disfunción mitocondrial, favoreciendo la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria (Thomas and Reed, 1988). De manera similar Fariss y cols. observaron una acumulación de ácido tiobarbitúrico y una marcada pérdida del contenido de GSH mitocondrial y citosólico en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Fariss et al., 1984). Estos resultados fueron concordantes con las investigaciones realizadas por Smith y Sandy donde observaron

un incremento de la producción de malondialdehído, en hepatocitos sujetos a deprivación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Smith and Sandy, 1985). Por tanto, dependiendo del tipo, concentración y tiempo de exposición a la molécula oxidante, el efecto sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares puede variar, activando o reprimiendo su entrada en la célula o su liberación desde los compartimentos celulares (Ermak and Davies, 2002).

### **5.3 Papel del calcio durante la colestasis**

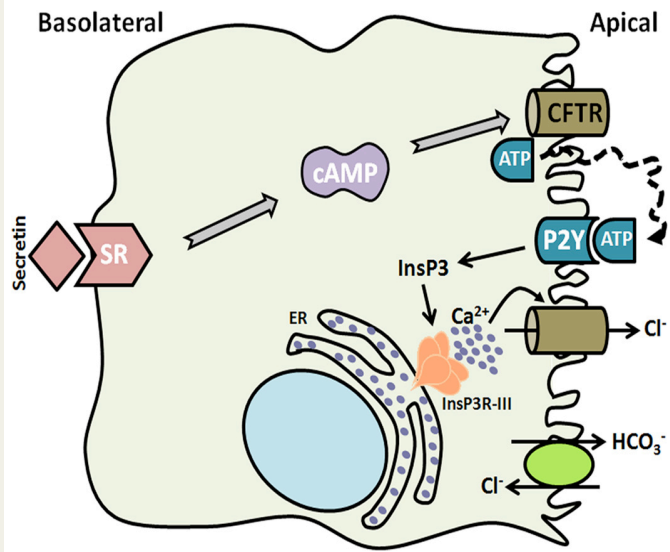
Como ya hemos señalado en el apartado 5.2, la secreción biliar constituye una de las funciones primordiales del hígado, estando regulada por la actividad combinada de los hepatocitos y colangiocitos. La existencia de defectos en este proceso se relaciona con el desarrollo de la enfermedad colestásica. La secreción de ácidos biliares y otros componentes de la bilis ocurre a través de los transportadores localizados en la membrana canalicular del hepatocito, y es modificada por la actividad secretora de los colangiocitos, a través de la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  y agua al lumen del conducto biliar (Boyer, 2013).

En condiciones fisiológicas, la actividad secretora de los colangiocitos se encuentra en parte regulada por el AMPc y por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 26). La unión de secretina a su receptor, situado en la membrana basolateral de los colangiocitos, desencadena la formación de AMPc intracelular y la activación sucesiva de la proteína quinasa A (PKA) y del regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR), localizado en la membrana apical. Esto favorece la liberación de ATP dependiente de CFTR, que a su vez estimula al receptor apical P2Y y promueve la producción local de  $\text{InsP}_3$ . La unión de  $\text{InsP}_3$  al receptor  $\text{InsP}_3\text{R}$  tipo III del RE provoca la liberación citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual se relaciona con la secreción de  $\text{Cl}^-$  al lumen del conducto biliar a través de CFTR. A su vez, la acumulación de  $\text{Cl}^-$  en el lumen del conducto biliar favorece la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  a través del intercambiador AE2 (Amaya and Nathanson, 2014) (Fig.26).



**Fig.26. Actividad secretora de los colangiocitos. Secreción de  $\text{HCO}_3^-$  por los colangiocitos a través de la vía de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ .**

La estimulación basolateral de los receptores de secretina resulta en el incremento de AMPc y la liberación apical de ATP dependiente de CFTR. Esto estimula a los receptores apicales P2Y y promueve la producción local de  $\text{InsP}_3$ , la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, la salida de  $\text{Cl}^-$  al lumen biliar y la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  (Amaya and Nathanson, 2014).



Debido al papel que desempeña el  $\text{Ca}^{2+}$  en la secreción biliar, la alteración de esta vía de señalización puede tener implicaciones directas durante la colestasis ductular (Guerra and Nathanson, 2015). En los colangiocitos, la pérdida del  $\text{InsP}_3\text{R}$  se relaciona con la alteración de la secreción biliar y el desarrollo de colestasis (Pusl and Nathanson, 2004). De hecho, pacientes con enfermedad hepática colestásica del tipo CBP, CEP y atresia biliar, presentan una menor expresión o incluso ausencia de dicho receptor en el epitelio biliar (Guerra and Nathanson, 2015; Shibao et al., 2003). Además, animales sometidos a BDL o tratados con lipopolisacáridos como modelo de colestasis experimental, muestran una pérdida en la expresión del  $\text{InsP}_3\text{R}$  tipo III (Hirata et al., 2002a; Shibao et al., 2003; Trauner et al., 1998). En el mismo sentido, el efecto citoprotector de UDCA y de su conjugado con taurina, TUDCA, se relaciona con la estimulación de la secreción de ATP y la consecuente inducción de la vía de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ , favoreciendo el flujo biliar (Nathanson et al., 2001). De este modo, el bloqueo de esta ruta se relaciona con la inhibición de la supervivencia celular (Marzioni et al., 2006).

Aunque la colestasis se asocia frecuentemente con defectos en los conductos biliares, la presencia de desórdenes genéticos o adquiridos en los transportadores de los hepatocitos pueden ser responsables del desarrollo de esta enfermedad (Trauner et al., 1998). En relación con el  $\text{Ca}^{2+}$ , estudios recientes han demostrado que la inserción del transportador MRP2 en la membrana plasmática es dependiente de este catión, por lo que la pérdida de expresión de  $\text{InsP}_3\text{R}$  se ha relacionado con la secreción alterada de aniones orgánicos en el hepatocito. Más aún, la pérdida de este receptor perjudica el efecto colerético de TUDCA durante la colestasis *in vitro* inducida por TLCA (Cruz et al., 2010). De manera similar, la pérdida de expresión de  $\text{InsP}_3\text{R}$  tipo III en la membrana canalicular de los hepatocitos se asocia con una peor secreción a través del transportador BSEP (Kruglov et al., 2011). Estos hallazgos sugieren que, durante la colestasis canalicular, la menor expresión de los transportadores en los hepatocitos podría ser, en parte, el resultado de la pérdida de la vía de señalización pericanalicular del  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto podría tener implicaciones en el tratamiento de las enfermedades colestásicas. Así, la enfermedad ósea es una complicación frecuente que acompaña a la CBP, asociada a una mala absorción del  $\text{Ca}^{2+}$ . En estos pacientes, el tratamiento con UDCA se relaciona con el incremento en la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  (Verma et al., 2002), la estimulación de la exocitosis biliar dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Beuers et al., 1993a; Beuers et al., 1993b) y la cooperación entre la PKC $\alpha$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que promueve la inserción del transportador MRP2 en la membrana canalicular (Beuers et al., 2001), y la PKA, responsable de fosforilar el  $\text{InsP}_3\text{R}$  tipo II favoreciendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Bruce et al., 2003).

De manera opuesta, otros estudios han demostrado que el desarrollo de colestasis está relacionado con la inducción de la vía de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ . Answer y cols. demostraron que los ácidos biliares conjugados y no conjugados incrementan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en hepatocitos aislados de rata, siendo el medio extracelular la mayor

fuelle de este electrolito y uno de los principales responsables de la pérdida de viabilidad celular (Anwer et al., 1988). De este modo, la retirada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular protege a los hepatocitos de la muerte celular e inhibe la proteólisis celular durante la citotoxicidad por GCDCA (Spivey et al., 1993). El empleo de ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , como el 2,5-di(ter-butil)-1,4-benzohidroquinona, el A23187 o la vasopresina, que incrementan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y/o el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del medio extracelular, se asocia con una mayor presión de perfusión y una reducción del flujo biliar en hígados perfundidos de rata (Nathanson et al., 1992a). Diversos estudios han relacionado la colestasis con la activación de las distintas isoformas de PKC, siendo algunas de ellas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (cPKC; isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (nPKC; isoformas  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ) o atípicas (aPKC; isoformas  $\zeta$ ,  $\iota$ ). No obstante, existe controversia en cuanto al papel de las distintas isoformas de la PKC en la formación de la bilis y en su participación durante la colestasis. Kubitz y cols. concluyeron que las cPKC no están involucradas en el efecto colerético del TUDCA. Así, mientras que la activación selectiva de cPKC por ttimeleatoxina (Ttx) induce colestasis hepática a través de la reducción del flujo biliar y de la excreción de TCA, la inhibición de PKC bloquea el efecto colestásico inducido por Ttx, sin ejercer ningún impacto sobre el efecto colerético de TUDCA (Kubitz et al., 2004). Otras investigaciones demuestran que el ácido biliar TLC, que actúa como un agonista de  $\text{Ca}^{2+}$ , reduce la capacidad de secreción de la bilis al canalículo biliar por activación de PKC $\epsilon$  en la membrana canalicular del hepatocito (Beuers et al., 1999). La apoptosis inducida por GCDCA incrementa la actividad de la PKC asociada a la membrana plasmática y se ha relacionado con la translocación de PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  y PKC $\epsilon$  en la membrana de los hepatocitos (Jones et al., 1997).

Independientemente de si el desarrollo de colestasis se asocia al bloqueo o a la inducción de la vía de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ , todos estos trabajos demuestran la importancia de esta ruta en la regulación del

flujo biliar. No obstante, también existen estudios que demuestran que la hepatotoxicidad inducida por sales biliares durante la colestasis experimental es independiente de los cambios en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Así, la perfusión hepática con LCA Y TLC se asocia con una disminución del flujo biliar y con el desarrollo de daño hepático, pero no con alteraciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Farrell et al., 1990).

#### **5.4 El calcio y su relación con la actividad NOS**

En relación al papel de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sobre la expresión/actividad de la NOS, el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y de calmodulina intracelular se relaciona con la activación de la NOS-3 y la producción de ON. Mientras que la actividad de la NOS-2 se considera independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que puede unirse con gran afinidad a la calmodulina incluso a concentraciones muy bajas de dicho ión, la NOS-3 requiere de una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mayor para poder activarse completamente (Alderton et al., 2001). Existen numerosos trabajos que relacionan el incremento de la expresión y actividad de la NOS-3 con el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La eritromicina es una droga antibacteriana y antiinflamatoria que mejora el daño provocado por los neutrófilos en el tracto respiratorio bajo. Su uso en células endoteliales de arteria pulmonar humana disminuye la producción de  $\text{O}_2\cdot$  (Mitsuyama et al., 1995) y aumenta los niveles de NOS-3 y la liberación de ON, a través de la activación de la PKA y del aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Mitsuyama et al., 1998). Por otro lado, la administración de resveratrol, un polifenol procedente de compuestos naturales, ejerce efectos cardiovasculares beneficiosos relacionados con la relajación del endotelio de la aorta, a través del incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y de la NOS-3 (Li et al., 2016). Además de los descritos, existen otros estudios que también relacionan la actividad NOS-3 con el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , pero de manera independiente a la activación de la vía AMPK/PKA. Así, la unión del ácido biliar TLCA al receptor de ácidos biliares acoplado a proteína G,

TGR5 (cuya expresión esta aumentada en vesícula biliar, intestino, bazo y placenta), se relaciona con el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la activación de la vía AKT y la actividad NOS-3 en las células endoteliales HUVEC, pero es independiente de la vía AMPc/PKA (Kida et al., 2013).

Pese a ser considerada una enzima independiente de  $Ca^{2+}$ , también la NOS-2 ha demostrado ser sensible a la  $[Ca^{2+}]_i$ . Park y cols. demostraron que el  $Ca^{2+}$  citosólico puede actuar como señal para inducir la expresión génica de la NOS-2 y la síntesis de ON en macrófagos peritoneales de roedor (Park et al., 1996). En células de músculo liso de la aorta abdominal de ratas sometidas a colestasis por BDL, Atucha y cols. demostraron que existe una sobreproducción de ON mediada por NOS-2, como consecuencia de la alteración de la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular y su movilización desde los compartimentos celulares. De este modo, la inhibición específica de esta isoforma de la NOS causó una normalización de los niveles de  $Ca^{2+}$  (Atucha et al., 2003).

A nivel hepático, el  $Ca^{2+}$  también desempeña una función esencial en los mecanismos de regulación de la NOS-3. Así, la esfingosina-1 fosfato (S1P), liberada por las plaquetas, ejerce un efecto antiapoptótico en las células endoteliales sinusoidales de hígado de rata expuestas a etanol, a través del incremento de la actividad NOS-3 mediado por un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  como consecuencia de la actividad PI3K (Zheng et al., 2006). Respecto a la colestasis, no existen estudios que relacionen esta enfermedad hepática con la desregulación de la expresión de la NOS-3 mediada por la  $[Ca^{2+}]_i$ .

## **6. EL CICLO CELULAR Y LA COLESTASIS**

La célula presenta dos estados claramente diferenciados que se alternan cíclicamente: un estado de interfase y otro de división denominado mitosis. Las células que no progresan en el ciclo permanecen en estado quiescente o fase G0. Mientras que en la interfase la célula realiza sus funciones específicas y se prepara para la

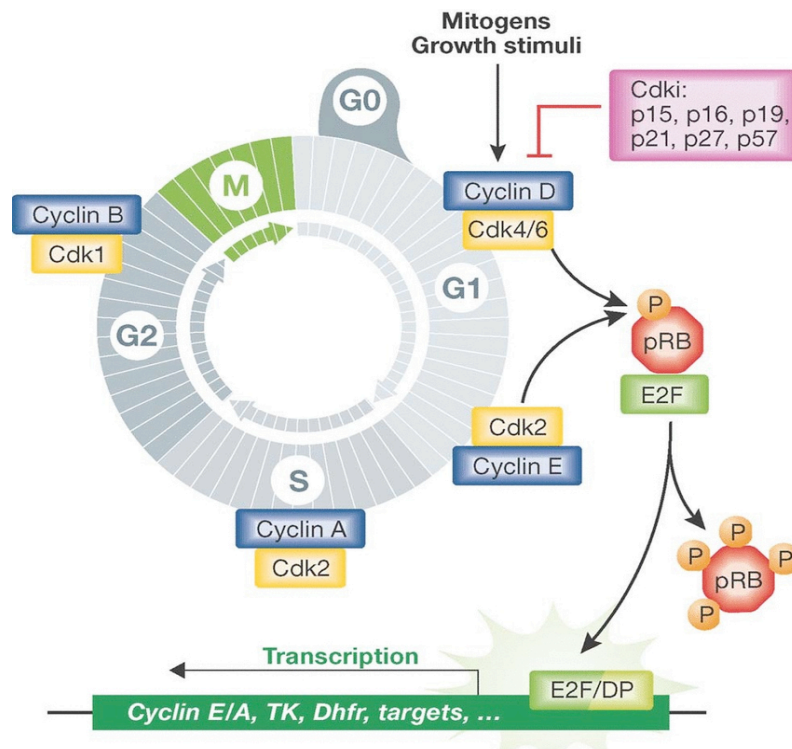
mitosis, la fase G0 es un periodo de latencia del ciclo celular donde la célula únicamente realiza las funciones propias del órgano.

Durante el ciclo celular se suceden, de manera ordenada, las fases de crecimiento o fase G1, de intensa actividad metabólica, la fase de síntesis de ADN o fase S, la fase premitótica o fase G2 y la fase de mitosis o fase M. El final de cada una de estas fases y el comienzo de la siguiente está estrechamente regulado por numerosos puntos de control donde intervienen diferentes factores.

## **6.1 Puntos de control del ciclo celular**

La función de estos puntos de control es evitar errores, asegurando la fidelidad e integridad de la replicación y la segregación del genoma. Están controlados por proteínas que son, por tanto, esenciales para el crecimiento celular normal (Fritsche et al., 1993). En la mayoría de los casos, la interrupción de la proliferación celular ocurre cuando la integridad del genoma ha sido comprometida. Alteraciones en este proceso permiten que células con genomas inestables evolucionen hasta células cancerosas. Tras una lesión en el ADN las células tienen la capacidad de detener la progresión del ciclo celular en una fase específica, inhibiendo la replicación del ADN y activando los procesos para su reparación. Existen dos puntos de control en el ciclo celular: al final de la fase G1, justo antes de entrar en fase S, y en la transición de la fase G2 a la fase M, justo antes de comenzar la mitosis (Fig.27). En estos puntos de control se examina el estado nutricional, la masa celular, el proceso de crecimiento y el estado del ADN para el inicio de un ciclo celular normal (Black, 2000; Blow and Nurse, 1990; Darzynkiewicz et al., 2001). Las ciclinas son unas proteínas que regulan la progresión del ciclo celular en células eucariotas a través de la unión a las quinasas dependientes de ciclinas ó cdk. En mamíferos se han identificado las ciclinas A, B, C, D1-3, E y H, y las cdk1 a cdk7.

**Fig.27. Ruta de activación de proteínas en el punto de control R.**



- Control del ciclo en G1 (o punto de restricción R):** el estado de fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) constituye el primer punto de control del ciclo celular. La fosforilación de esta proteína ocurre en las fases G1 y S, regulando tanto la transición G1-S como la progresión hacia la fase S. Cuando la célula supera este punto se ve obligada a completar el ciclo celular. En células normales en reposo, la pRb se encuentra hipofosforilada y asociada al FT E2F (factor de elongación de la transcripción) (Hall et al., 1993). Cuando las células quiescentes entran en ciclo, la ciclina D1 aumenta su concentración y se ensambla a las quinasas dependientes de ciclinas cdk2, cdk4 y cdk6, activándolas (Sherr, 1993). Como consecuencia, se inactiva la pRb y se activa la síntesis de las ciclinas E y D. En la fase G1 tardía se conforma el complejo ciclina E/cdk2, denominado factor promotor de la replicación (FPR), y se completa el proceso de fosforilación de pRb (Meyerson and Harlow, 1994; Mittnacht et al., 1994; Sherr, 1996; Taya, 1997). En ese momento, se liberan las dos subunidades de E2F

(Bandara et al., 1993; Girling et al., 1993), permitiendo la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo. Este proceso se encuentra regulado por los inhibidores de las cdk (cdki) (Fig.27).

- **Control del ciclo en G2:** durante la entrada en fase G2 aumenta la concentración de ciclina mitótica B, que se une a la cdk2 para formar el factor promotor de la mitosis (FPM), el cual participa en la condensación de la cromatina, la rotura de la membrana nuclear y la formación del huso mitótico (Kubbutat et al., 1997; Pinon et al., 1999). Además de estas, existen otras ciclinas y cdk que intervienen en la regulación de las diferentes fases del ciclo celular. Entre ellas, podemos mencionar a la ciclina F, implicada en la transición G2-M [285], la ciclina G, que actúa en respuesta al daño del ADN [286], o la ciclina H, que interactúa con cdk7 para formar la quinasa activadora de las cdk.

La presencia de alteraciones en la formación de los complejos ciclina/cdk se ha relacionado con el crecimiento celular descontrolado y, de manera opuesta, con la muerte celular. En este sentido, el desarrollo de diversos tipos de tumores cursa con sobreexpresión de ciclina D1 y, paradójicamente, con la supresión del crecimiento celular a través de una mayor susceptibilidad a la apoptosis (Hunter and Pines, 1994; Sofer-Levi and Resnitzky, 1996). De manera similar, la enfermedad hepática colestásica se ha relacionado la alteración del ciclo celular, caracterizada por una expresión desregulada de las cdki, p21, p53 y p57 en hepatocitos y colangiocitos de pacientes con atresia biliar, CBP y CEP (Meng et al., 2015). Así, la inhibición de la proliferación celular en hígados de pacientes con CBP se ha relacionado con un incremento de la expresión de p27 y, en consecuencia, con una insuficiente regeneración hepática. El tratamiento con UDCA en los primeros estadios de la enfermedad, atenuó la expresión de p27 y ejerció un efecto protector al aumentar la proliferación celular (Milkiewicz et al., 2014). De manera similar, p21 es un inhibidor reversible de la progresión de ciclo celular y su sobreexpresión se ha relacionado con la destrucción de los colangiocitos por apoptosis a



través de un mecanismo dependiente de p53 durante la CBP (Harada et al., 2001). En otros estudios, la sobreexpresión de ciclina D1 durante la citotoxicidad inducida por el ácido biliar DCA, promovió la apoptosis en un cultivo primario de hepatocitos de rata a través de un mecanismo dependiente de p53. Por contra, la preincubación con UDCA y TUDCA abolió la sobreexpresión de la ciclina D1 y la apoptosis inducida por DCA (Castro et al., 2007).





### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La principal característica común a todas las formas de enfermedad colestásica es la alteración del flujo de los ácidos biliares en la circulación enterohepática y, como consecuencia, su acumulación a nivel intracelular y en la circulación sistémica. Algunos desórdenes colestásicos, como la atresia biliar o la presencia de cálculos biliares en el colédoco, puede prevenirse a través de procedimientos quirúrgicos, restaurando nuevamente el flujo de la bilis. Sin embargo, en otras patologías colestásicas la única opción curativa resulta ser el trasplante hepático. Por otro lado, existe un número limitado de opciones de tratamiento farmacológico para algunas enfermedades colestásicas crónicas en adultos. Así, la terapia con UDCA resulta útil en el tratamiento de la CBP, la CEP o la CIE, aunque su eficacia puede ser limitada en algunas circunstancias (Bessho and Bezerra, 2011) (Zein and Lindor, 2010) (Maillette de Buy Wenniger and Beuers, 2010).

Uno de los objetivos de las nuevas estrategias anticoléstásicas se centra en reducir el tamaño del conjunto de ácidos biliares, actuando sobre la síntesis *de novo* o favoreciendo su eliminación, interrumpiendo así la circulación enterohepática de los mismos (Wagner and Trauner, 2016). A pesar de que la etiología de los distintos trastornos colestásicos está actualmente bien definida y ha sido ampliamente estudiada en diversos modelos experimentales de colestasis, resulta necesario disponer de una mayor comprensión de los mecanismos de toxicidad que ejercen los ácidos biliares. De este modo, sería posible diseñar nuevas estrategias terapéuticas eficaces y seguras, o bien optimizar las terapias existentes para el tratamiento de estas enfermedades. El GCDCA es una de las sales biliares más representativas en el suero de pacientes colestásicos (Woolbright et al., 2015) y su acumulación en el hígado durante la colestasis ha sido directamente asociada con el daño hepatocelular (Spivey et al., 1993). Por tanto, GCDCA es considerado un excelente candidato para valorar los mecanismos de toxicidad por acumulación de sales biliares en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, la adición de sales biliares hidrofóbicas (como el

GCDCA) es un buen modelo experimental para valorar los mecanismos de muerte celular en la colestasis, así como valorar posibles alternativas terapéuticas. Los mecanismos de daño hepático asociados a las sales biliares han sido relacionados con la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la muerte celular. En este sentido, el uso terapéutico de los antioxidantes ha suscitado interés para el tratamiento de las enfermedades colestásicas (Galicia-Moreno et al., 2012; Gane et al., 2010; Spirli et al., 2003).

El ON representa un papel clave en el metabolismo y en la lesión hepática, ejerciendo un papel proapoptótico (Coskun et al., 2001; Moussa et al., 2000) o antiapoptótico (Fiorucci et al., 2001b) dependiendo de diversos factores (Iwakiri and Kim, 2015). La desregulación de la expresión de la NOS-3 podría actuar como un factor clave durante la progresión del daño hepático. En condiciones fisiológicas, la síntesis de ON a partir de la NOS-3 resulta ser esencial para la correcta regulación del flujo sanguíneo hepático (Palmer et al., 1987). Sin embargo, durante la enfermedad hepática colestásica, el papel de la NOS-3 no ha sido claramente establecido.

El presente trabajo parte de la hipótesis de que la acumulación de sales biliares que ocurre durante la colestasis provoca una respuesta hepatocelular prooxidante y proapoptótica, que podría estar regulada por la biodisponibilidad de ON sintetizado por la NOS-3. Por ello, los objetivos, general y específicos, de este proyecto de tesis doctoral son:

## **1. Objetivo general**

Clarificar los mecanismos moleculares que subyacen a la citotoxicidad hepatocelular durante la enfermedad hepática colestásica, en relación con la regulación de NOS-3. Para su consecución, hemos utilizado un modelo de colestasis experimental *in vitro* en la línea celular HepG2, y hemos propuesto los siguientes objetivos específicos.

## **2. Objetivos específicos**

- 2.1.** Estudiar la movilización del calcio celular y su relación con la regulación de la expresión de NOS-3 y la muerte celular durante la colestasis experimental *in vitro*.
- 2.2.** Estudiar la relación entre el estrés oxidativo y la muerte celular durante la colestasis experimental *in vitro*. Evaluar el papel que desempeña NOS-3 en este proceso y valorar las propiedades citoprotectoras de los antioxidantes N-acetilcisteína (NAC), Mn (III) tetrakis (ácido 4-benzoico) porfirina (MnTBAP) y mitoquinona (MitoQ).
- 2.3.** Identificar los factores implicados en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la colestasis experimental *in vitro*. Evaluar la actividad del promotor de NOS-3.
- 2.4.** Estudiar la regulación de la expresión de NOS-3 en un modelo de colestasis *in vivo*. Relacionarlo con el modelo *in vitro*.





## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**



# 1. MATERIALES Y REACTIVOS

Todos los materiales y reactivos empleados durante la ejecución de esta tesis doctoral fueron de la calidad y pureza suficientes, para el desarrollo de técnicas de biología molecular/celular, y cultivos celulares. Las compañías que suministraron los productos se detallan a continuación:

- **Abcam** (Cambridge, Reino Unido): anticuerpo anti-pSp1.
- **Albion Surgicals** (South Yorkshire, Reino Unido): bisturí estéril.
- **Amersham Biosciences** (Nueva Jersey, EE.UU): columnas de Sephadex G25 (MicroSpin™ G-25).
- **Bachem AG** (Budendorf, Suiza): N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometil coumarina (Ac-DEVD-AFC).
- **B. Braun-Dexon S.A.** (Barcelona, España); ligadura de seda de tipo 3/0 y sutura de nailon de tipo 5/0 de seda.
- **Becton Dickinson** (Nueva Jersey, EE.UU): tubos Vacutainer™.
- **Bioline** (Londres, Reino Unido): Trisure, kit SensiFAST™ SYBR No-ROX.
- **Biopack** (Buenos Aires, Argentina): Hematoxilina de Weigert (solución A y solución B).
- **Bio-Rad** (Múnich, Alemania): solución de Bradford, solución de poliacrilamida, marcador de peso molecular, Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1), dual color precisión plus, membrana de nitrocelulosa, papel absorbente Whatman.
- **Biowest** (Nuaille, Francia): suero fetal bovino, Tripsina/EDTA.
- **Calbiochem** (Darmstadt, Alemania): Mn (III) tetrakis (ácido 4-benzoico) porfirina (MnTBAP).
- **Cell Signaling** (Massachusetts, EE.UU): anticuerpo anti- pERK1/2, anticuerpo anti-ciclina D1
- **Dako Envision System** (Barcelona, España): eosina, solución azuleante, tampón citrato (ChemMate™ Target Retrieval Solution pH 6.0), solución de peróxido de hidrógeno, cromógeno 3,3'-

diaminobencidina (DAB), polímero marcado con HRP conjugado con el anticuerpo secundario.

- **Diagenode** (Liege, Bélgica): rack magnético (DiaMag 1.5 magnetic rack).
- **Dominion-MBL** (Córdoba, España): marcador de ADN de peso molecular 500pb-10 kb.
- **Exsa** (Buenos Aires, Argentina): fluorometil 2,2,2-trifluoro-1 (trifluorometil) etil éter o sevoflurano.
- **Favorgen Biotech Corp.** (Ping-Tung, Taiwán): Favor Prep™ Gel/PCR purification mini kit.
- **Fresenius Kabi** (Bad Homburg, Alemania): Solución salina (NaCl 9mg/ml).
- **GE Healthcare Life Sciences** (Little Chalfont, Reino Unido): Plus One Sample Grinding kit, solución de bloqueo rica en proteínas, reactivos de detección ECL Advance (solución A y B), autorradiografías.
- **Gibco** (California, EEUU): Medio Esencial Mínimo Eagle (MEM).
- **Greiner bio-one** (Frickenhausen, Alemania): placa de 96 pocillos de fondo transparente.
- **Grifols** (Barcelona, España): agua.
- **Intron Biotechnology INC** (Seongman, Korea del Sur): DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit.
- **Invitrogen** (California, EE.UU): TA cloning kit, One Shot® Escherichia coli.
- **Jet Biofil** (Guangzhou, China): filtros de 0,22 µm.
- **Life Technologies** (California, USA): dihidroetidido (DHE), 2,7 diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA), 10-Acetil-3,7-dihidroxifenoxacino (ADPH), bolas magnéticas (dynabeads®).
- **MatTek Corporation** (Massachusetts, EEUU): placas de cultivo de 30mm<sup>2</sup> de diámetro, con fondo de vidrio de 10mm<sup>2</sup>.
- **Merck** (Darmstadt, Alemania): cloroformo, isopropapanol, etanol, ácido acético glacial, alcohol de 100°, hematoxilina (Hematoxilina Papanicolaou´s de Harris), HCl, NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>.
- **New England Biolabs** (Massachusetts, EEUU): Endonucleasas HindIII y KpnI.

- **Nunc** (Roskilde, Dinamarca): frascos de cultivo celular.
- **O. Kindler** (Ziegelhofstr, Alemania): medio de montaje Eukkit.
- **PAA Laboratories** (Pasching, Austria): piruvato sódico, penicilina, estreptomicina sulfato/amfotericina B.
- **Panreac AppliChem** (Barcelona, España): paraformaldehído al 4%, metanol.
- **Promega** (Wisconsin, EEUU): vector pGL4.20 [luc2/Puro], pGL3 Basic, pRL-SV40, One-Glow™ Luciferasa Assay System, kit RQ1 RNAsa-Free DNase, oligonucleótido de AP-1, polinucleótido quinasa del fago T4 (T4PNK).
- **Purina®** (Barcelona, España): alimentación para las ratas.
- **Qiagen** (Hilden, Alemania): QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR, kit de purificación de ADN en columna (QIAquick® PCR purification kit).
- **Roche** (Indianápolis, USA): calibrador, piruvato sódico, FUGENE® 6, placas de PCR de 96 pocillos, lactato deshidrogenasa, inhibidores de proteasas complete Mini-EDTA-free A, ARNasa, proteinasa k.
- **Santa Cruz Biotechnology** (California, EEUU): anticuerpo anti-NOS-3, anti-(p)cJun, anti-(p)cFos, anti-Sp1, anti-pJNK, anti-β-Actina, anti-CD68, donkey anti-goat, goat anti-rat, goat anti-rabbit, oligonucleotido de SP1, anticuerpo anti-CD68. Ácido 2,4,6,8 nonatetraenoico (E,E,Z,E)-3 metil-(4-metilfenil)-9-(2,6,6 trimetil-1-ciclohexen-1-il) (SR 11302).
- **Scharlab** (Barcelona, España): formaldehído, solución de fucsina azul de anilina.
- **Sigma-Aldrich** (Missouri, EE.UU): bromuro de etidio, glicerol, puromicina, azul tripán, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido glicoquenosodesoxicólico (GCDCA), N-acetilcisteína, (NAC), catalasa ácido tetraacético etilenglico (EGTA), alopurinol, hipoxantina, xantina oxidasa, A23187, tapsigargina, albúmina de suero bovino (BSA), Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tizolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT), NADH, coenzima Q<sub>1</sub>, antimicina A (1mg/ml) en etanol, rotenona, succinato, 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP), citocromo c, KCN, ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), Acetil Coenzima A, oxalacetato (OAA), piruvato sódico, ácido plurónico (Pluronic-F127), agua libre de ARNasas y ADNasas, cebadores para qRT-PCR cuantitativa y absoluta,

persulfato amónico (APS), N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina, TEMED, rojo Ponceau, nitrato reductasa, flavinadeninucleótido (FAD), ZnSO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>Na, oligonucleótidos de ADN para MAZ y GATA, sal sódica del ácido polideoxinosínico-deoxicitidílico [poly(dI-dC)- poly(dI-dC)], casete de autoradiografía con pantalla de intensificación de la señal, solución reveladora y fijadora, ARNt.

- **Takara** (Shiga, Japón): λADN.
- **Thermo scientific** (Waltham, Massachusetts USA): placa de cultivo de 96 pocillos, Gene Ruler 1Kb DNA ladder (0,1 µg/µl).
- **TPP** (Schaffhausen, Suiza): placas de cultivo celular.
- **US Biological** (Massachusetts, EEUU): agarosa, dodecilsulfato sódico (SDS), glicina, NaCl.
- **VWR International** (Pensilvania, EEUU): portaobjeto de vidrio recubierto de poli-L-lisina (Polysine™).

## 2. APARATOS

En la siguiente tabla se resumen todos los aparatos utilizados durante el desarrollo de esta tesis doctoral, indicando su nombre, marca, modelo y función para la que han sido requeridos.

**Tabla 5. Aparatos empleados.**

<b>Nombre#</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>	<b>Función</b>
Agitador rotatorio circular	PJ SELECTA		Incubaciones con agitación rotatoria
Autostainer	Dako	LV-1	Inmunohistoquímica
Balanza de precisión	Mettler Toledo	AB-204S	Pesar reactivos y tejidos
Baño termostatzado	PJ SELECTA	Unitronic OR	Atemperar reactivos, transformación
Bomba de vacío	Millipore		Filtración de soluciones
Cabina de flujo laminar vertical	Telstar	AV-100	Zona de trabajo estéril
Cámara Hamamatsu ORCA	Hamamatsu Photonics	II BT	Monitorización de cultivos celulares

Centrifuga	Thermo Scientific	Jouan CR3i	Centrifugaciones con temperatura regulable
Congelador -20°C /-80°C	Liebherr/Revco	-/UXF	Conservación de reactivos y muestras biológicas
Contenedor de nitrógeno	Taylor-Wharton	M 505CE-B	Almacenamiento de líneas celulares
Densitómetro	BIO-Rad	GS-800	Escanear geles
Dispensador de parafina	Leyca	EG1120	Formación de bloques de parafina
Electroforesis horizontal	Bio-Rad	Sub-Cell GT	Separación de ácidos nucleicos
Electroforesis vertical	Bio-Rad	Mini-Protean III/Protein II xi cell	Separación de proteínas
Espectrofotómetro	Thermo Scientific	ND-1000	Cuantificar ácidos nucleicos
Espectrofotómetro placas	Tecan	Genios	Actividad enzimática y cuantificación proteica
Espectrofotómetro termostatzado	Hitachi	U-3900H	Actividad enzimática
Frigorífico	Fagor		Conservación de reactivos
Fuente de alimentación	Bio-Rad	Power PAC1000	Aplicar voltaje
Incubador de CO <sub>2</sub>	Thermo Scientific	Revco Elite II	Crecimiento y mantenimiento de líneas celulares
Incubador con agitación orbital	Bootmingen	4103	Crecimiento de bacterias
Mechero Bunsen	PJ SELCTA		Zona de trabajo estéril
Microcentrifuga	Eppendorf	5417R	Centrifugaciones termostatzadas
Microondas	Solac		Fundir agarosa
Microscopio de fluorescencia	Nikon	TE-2000-E	Visualización de cultivos celulares
Microscopio óptico invertido	Motic	AE31	
Micrótomo de parafina	Leyca	RM2255	Cortes histológicos



pHmetro	Crison	pH-Meter Basic 20+	Medición de pH
Pipeta automática	HTL	Lab mate	
Pipeteador eléctrico	HTL	SWIFTPET PRO	Pipetear volúmenes
Secador de geles	SCIE-PLAS	GD-5040	Secar geles
Sistema de análisis de imagen	Fugifilm	LASS 3000	Captura de imágenes
Sistema de deshidratación	Leyca	TP1020	Deshidratación de muestras histológicas
Sistema de homogeneización	Abratools	TB-13/5	Homogenados celulares y tisulares
Sistema de transferencia	Bio-Rad	Trans-Blot	Transferir proteínas a membrana
Termoagitador	Eppendorf	Thermomixer 5436	Incubaciones
Termociclador Gene Amp	Perkin Elmer	PCR System 2400	PCR a tiempo final
Termociclador LightCycler	Roche	LC-480	qRT-PCR
Transiluminador U.V	Upland	M-20	Visualizar ácidos nucleicos
Vortex	VELP científica		Disolver soluciones y homogeneizar extractos celulares

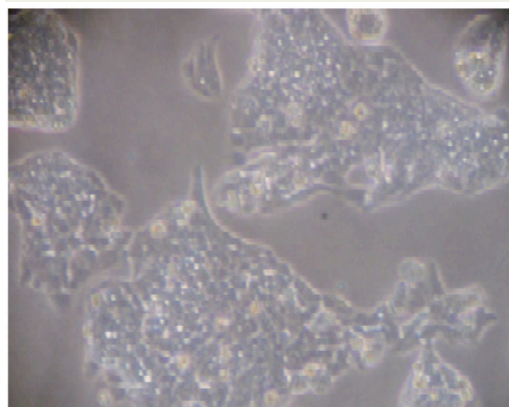
### 3. CULTIVOS CELULARES. ESTUDIOS ( ) # \* ( + , -

El cultivo de las líneas celulares se realizó en una cabina de flujo laminar vertical Telstar AV-100, con la finalidad de evitar cualquier foco de contaminación procedente del ambiente. Previamente, la superficie de trabajo se limpió con etanol 70% y se expuso a radiación ultravioleta durante 30min. Todo el material empleado en la manipulación de las líneas celulares fue sometido a esterilización. Del mismo modo, los reactivos utilizados fueron previamente esterilizados por filtración con ayuda de un filtro de 0,22µM acoplado a una bomba de vacío.

### 3.1 Cultivo celular

La línea celular HepG2 (Fig.28), obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), la constituyen células adherentes, aisladas a partir de un hepatocarcinoma bien diferenciado procedente de un varón caucásico de 15 años de edad. Las células se cultivaron a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup> en frascos de

**Fig.28. Línea celular HepG2.**



75cm<sup>2</sup> y fueron mantenidas en Medio Esencial Mínimo Eagle (MEM) con rojo fenol, rico en glucosa (1g/l) y L-glutamina (0,292g/l). Previamente, el medio de cultivo fue suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) descomplementado por choque térmico a 56°C durante 45min, 1mM piruvato sódico, y 0,1% de una mezcla de antibiótico y antimicótico. El medio de cultivo fue renovado cada 48h hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente, momento en el cual fueron subcultivadas, criopreservadas o utilizadas para los distintos procedimientos experimentales. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador Revco Elite II, a 37°C y en un ambiente humidificado, conteniendo un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>.

Previo a la incorporación del SFB al medio de cultivo fue necesario descomplementarlo para inactivar las proteínas del complemento. El SFB contiene hasta 14mg/ml de inmunoglobulinas, por lo que la adición de un 10% de SFB supone una incorporación de 1,4mg/ml de anticuerpos al medio de cultivo. Aunque la gran mayoría de inmunoglobulinas no reconocerá a ningún antígeno de las células en cultivo, basta con que una proporción menor al 1% lo haga para fijar al complemento y lisar las células. Es por ello que resulta fundamental inactivar las proteínas de la cascada del complemento, desnaturalizándolas a 56°C durante 45min.

### 3.2 Obtención de la línea celular pGL4-NOS3

Para el estudio de la actividad transcripcional de NOS-3 se empleó la línea celular pGL4-NOS3. Esta fue obtenida mediante transfección estable de la línea HepG2 con el vector pGL4.20 [luc2/Puro] conteniendo el ADNc del gen reportero de la luciferasa de luciérnaga (luc2) bajo control de un fragmento de 1.601 pares de bases (pb) perteneciente al promotor del gen NOS-3. La construcción de dicho vector se realizó a partir del plásmido pGL3-NOS3, cedido amablemente por el Dr. Huige Li del Departamento de Farmacología de la Universidad Johannes Gutenberg de Maguncia, Alemania. (Fig.29).

**Fig.29. Secuencia del promotor humano del gen NOS-3.** Fragmento de 1.601pb correspondiente a la región promotora flanqueante 5' del gen humano NOS-3 (GenBank AF387340.1). Círculo: codón de inicio (ATG) y posición -1 del promotor de NOS-3 (C).

```

ctgatgctgc ctgtcacott gaccctgagg atgccagtca cagctccatt aactgggacc -1542
taggaaaatg agtcatoctt ggtcatgcac atttcaaagt gtggottaat atggaagoca -1482
gacttgggat ctgttgtctc ctccagcatg gtagaagatg cctgaaaagt aggggctgga -1422
tcccatcccc tgcoctactg ggaaggcagag gtggtggggg ggggtggggc ctccaggcttg -1362
gggtcatggg acaaagocca ggotgaatgc cgcocctcca tctccctcct cctgagacag -1302
gggcagcagg gcacactagt gtccaggagc agcttatgag gccocctcac cctccatcct -1242
ccaaaactgg cagaccccac cttcttggtg tgaccccaga gctctgagca cagcccgttc -1182
cttcgcctg cgggcccccc acccaggccc accccaaact tatcctccac tgcctttcag -1122
aggagtctgg ccaacacaaa tcctcttggt tgtttgtctg tctgtctgct gctcctagtc -1062
totgcctctc ccagtctctc agcttcogtt tctttcttaa actttctctc agtctctgag -1002
gtctcgaaat cacgaggctt cgaccocgtg ggaccagatg cccagctagt ggcctttctc -942
cagccccctc gatggcacag aactacaaac cccagcatgc actctggcct gaagtgcctg -882
gagagtgtct gtgtaccca cctgcattct gggaaactga gtttccttag tccccatgc -822
tcccaccagg gcatcaagct ctccctggc cggctgacc tgccctagcc ctagtctctc -762
tgctgacctg cggccccggg aagcgtgcgt cactgaatga caggggtggg gtggaggcacc -702
tggaaggcag ctccctgctc ttttgtgtec cccacttgag tcatgggggt gtgggggttc -642
caggaaattg gggctgggag gggaaaggat accctaatgt cagactcaag gacaaaaagt -582
cactacatcc ttgctgggoc tctatcccca agaaccocaa aggactcaag ggtggggatc -522
caggagtctc tgtatgtatg gggggaggtg aaggagagaa cctgcatgac cctagaggtc -462
cctgtggtea ctgagagtgt gggctgccat ccctgctac agaaacgggt ctcacctctc -402
gccccaccct ccagggaaag gcacacaggg gtgaggccga aggcccttcc gtctgggtgcc -342
acatcacaga aggacctta tgaccocctg gtggctctac cctgccactc cccaatgccc -282
cagcccccat gctgcagccc cagggetctg ctggacacct gggctcccac ttatcagcct -222
cagtccctac agcggaaacc aggcgtccgg cccccaccc ttcaggccag cgggctgga -162
gctgaggctt tagagcctcc cagccggget tgttccctgct ccattgtgta tgggataggg -102
gcggggagag ggccagcact ggagagcccc ctcccactgc cccctcctct cgggtcccctc -42
cctcttcta aggaaaaggc cagggetctg ctggagcagg Cagcagagtg gacgcacagt 19
aacATGggca acttgaagag cgtggcccag gagcctgggc caccctgagg cctggggctg 79

```

### 3.2.1 Secuenciación

Tras su recepción, el plásmido pGL3-NOS3 fue secuenciado en ambas direcciones para comprobar que el fragmento del pNOS-3 contenido en él, y que precedía al codón de inicio ATG del gen (número de acceso del GenBank AF387340.1), no contenía errores en su secuencia. La secuenciación se realizó en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba (UCO), empleando la siguiente pareja de oligonucleótidos universal:

- RVprimer3 (sentido): 5´CTAGCAAATAGGCTGTCCC 3´.
- GLprimer2 (antisentido): 5´CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA 3´.

El RVprimer3 se localiza en la posición 4.760-4.779 del plásmido, entre el origen de replicación del plásmido (f1 ori, 4.072-4.527) y el sitio de clonaje múltiple (MCS 1-58). La localización para GLprimer2 fue en la posición 98-11, justo detrás del MCS.

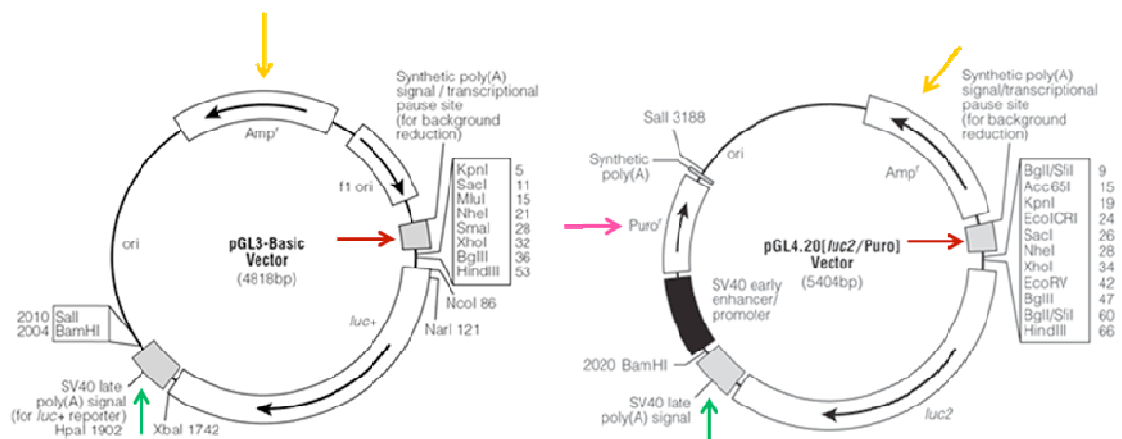
Tras la secuenciación se empleó un programa informático de alineamiento de secuencias conocido como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esta herramienta es de dominio público y puede ser utilizada de forma libre a través del servidor del centro nacional para la información biotecnológica (NCBI). BLAST permite comparar una secuencia problema frente a la totalidad de secuencias que se encuentran recogidas en la base de datos del NCBI. Tras comparar la secuencia de 1.601pb frente a todo el genoma humano, el análisis de alineamiento, reveló un 100% de homología con el pNOS-3 de humano.

### 3.2.2 Digestión de los plásmidos

Para clonar el inserto de interés, es decir, el fragmento del pNOS-3 en el plásmido pGL4.20 [luc2/Puro], fue necesario rescatarlo del vector pGL3-Basic donde se encontraba originalmente (Fig.30). Previo al proceso de transfección estable, intentamos desarrollar un sistema de cotransfección transitoria empleando la construcción pGL3-NOS3 y un

segundo plásmido pRL-SV40 que contenía el ADNc de la luciferasa Renilla (Rluc). Rluc es una proteína monomérica de 36kDa que no requiere modificación postraducciona para desarrollar su actividad, siendo por ello ampliamente empleada como reportero génico. El vector pRL-SV40 contiene en su secuencia elementos del promotor y potenciadores del gen de origen viral SV40, proporcionando una expresión fuerte y constitutiva de Rluc. Esta propiedad le ha permitido ser utilizado como control interno para la normalización de los valores de expresión de luc2. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, y tras numerosos intentos, no fue posible desarrollar este sistema ya que la eficiencia de la transfección con el sistema de dos plásmidos fue muy baja, obteniéndose unos valores de luminiscencia muy similares a los del ruido de fondo. Por ello, finalmente decidimos trabajar con el sistema de transfección estable de un solo plásmido.

**Fig.30. Plásmidos pGL3-Basic y pGL4.20 (luc2/puro).** La expresión de la luciferasa depende de la correcta inserción de un promotor funcional precediendo al gen luc+/luc2. Flecha roja: sitio de clonación múltiple (MCS) donde se ha insertado un fragmento (1.601pb) del pNOS-3 humano regulando la expresión luciferasa. Flecha verde: señal de poli-adenilación que asegura la terminación de la transcripción. Flecha amarilla: gen de resistencia a ampicilina de selección positiva de transformación. Flecha rosa: gen de resistencia a puromicina de selección positiva de transfección.



En el vector pGL3-NOS3, la secuencia pNOS-3 se encontraba flanqueada por los sitios de restricción para las endonucleasas Hind III y Kpn I. Del mismo modo, el sitio de clonación múltiple del plásmido pGL4.20 contenía sitios de reconocimiento únicos para ambas enzimas (Fig. 30 y 31). Por tanto, Hind III y Kpn I fueron empleadas para:

- Recuperar el inserto de interés pNOS-3 del plásmido pGL3-NOS3.
- Linearizar el plásmido pGL4.20 [luc2/Puro] para poder clonar en él el fragmento del pNOS-3 obtenido a partir de pGL3-NOS3.

Para la doble digestión enzimática, 2,5µg del vector pGL3-NOS3 y 1µg del vector pGL4.20 fueron mezclados con 20 unidades (U) de Hind III y 10 U de Kpn I, en el tampón apropiado (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM ditiotreitól, pH 7,9) más BSA, durante 2h a 37°C.

**Fig. 31. Sitio de clonación múltiple de los plásmidos** (A) pGL3-Basic y (B) pGL4.20 (luc2/puro). Localización de los distintos sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Hind II y Kpn I fueron utilizadas simultáneamente para recuperar el fragmento de pNOS-3 del vector pGL3-Basic, y crear sitios de restricción en el vector pGL4.20 (luc2/puro) para la clonación del inserto de interés.



### 3.2.3 Purificación de los productos de la digestión

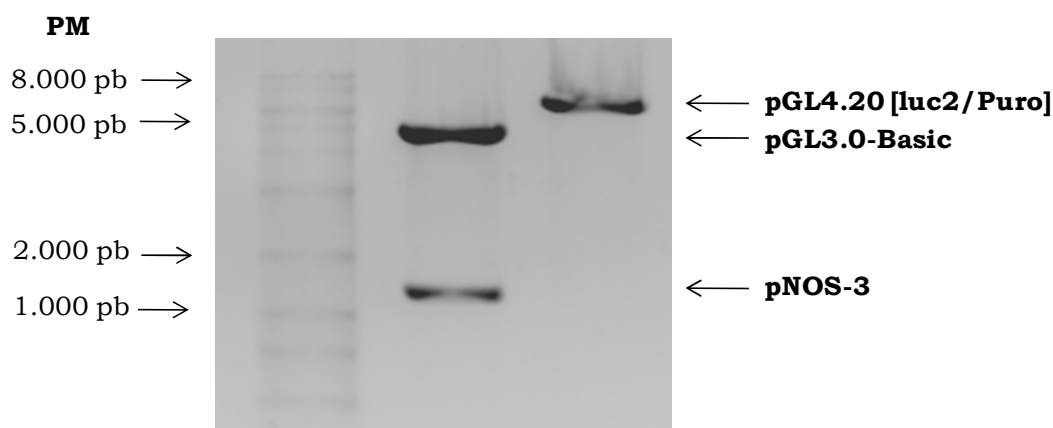
Los productos de las digestiones enzimáticas fueron analizados mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE [50mM Tris-HCl pH 8, 50mM ácido bórico, 1mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)], con 0,5µg/ml de bromuro de etidio como agente intercalante. Para la preparación del gel, la agarosa en polvo fue disuelta al 1% (p/v) en tampón TBE, a una temperatura de 60-70°C con ayuda de un microondas. A continuación, una vez enfriada la solución lo suficiente como para no quemar al tacto, se incorporó el bromuro de etidio, se agitó cuidadosamente y se vertió la mezcla sobre el molde del gel, dejándolo solidificar durante 20min a temperatura ambiente (TA), con el peine colocado.

Antes de cargar las muestras en el gel, los productos de las digestiones enzimáticas (20µl) se mezclaron con 1/3 del tampón de carga LB (Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1% [p/v] en TBE). Para conocer el tamaño de los fragmentos de ADN, se utilizó un marcador comercial conteniendo fragmentos de ADN de pesos moleculares conocidos entre las 500pb y las 10 kb. Tras sumergir el gel en tampón TBE y cargar las muestras de ADN en los respectivos pocillos o 'calles', se desarrolló la electroforesis a 60 voltios (V) constantes, durante 1h aproximadamente, empleando una fuente de alimentación. Finalmente, los fragmentos de ADN fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. El bromuro de etidio tiene la capacidad de combinarse entre los ácidos nucleicos y, tras su exposición a la luz ultravioleta, emitir una luz roja-anaranjada intensificada.

Las bandas de ADN correspondientes al vector pGL4.20 [luc2/Puro], con un tamaño de 5.404pb, y al fragmento pNOS-3, de 1.601pb (Fig.32), fueron recortadas del gel con ayuda de un bisturí estéril y purificadas con el "*Favor Prep™ Gel/PCR purification mini kit*", siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, cada

fragmento de agarosa conteniendo el ADN de interés fue incubado por separado con el tampón suministrado, a 55°C y con agitación, hasta la completa disolución del gel. A continuación, la solución se transfirió a una columna conteniendo un filtro de sílice incorporado, y se centrifugó a 18.000g durante 30s a TA. El ADN retenido en el filtro se lavó con una solución de lavado conteniendo etanol puro, y se eluyó en el volumen aconsejado de tampón de elución mediante centrifugación a 21.000g durante 2min a TA.

**Fig.32. Comprobación del resultado de la digestión en un gel de agarosa al 1%.** Los fragmentos de tamaño compatible con el plásmido pGL4.20 [luc2/Puro] y pNOS-3 fueron extraídos del gel y purificados (PM: peso molecular).



### 3.2.4 Cuantificación del ADN

Previo al proceso de ligación entre el fragmento del pNOS-3 y el vector pGL4.20 [luc2/Puro] fue necesario cuantificar el ADN para saber qué cantidad de inserto y de vector iba a ser utilizado.

La concentración y la pureza del ADN total se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop®ND-1000 mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260nm y 280nm. La lectura de la absorbancia a una  $\lambda_{260\text{nm}}$  permitió calcular la concentración de ADN presente en la muestra tomando como referencia que 1 unidad de  $\text{DO}_{260\text{nm}}$  corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/ml}$  de ADN de doble hebra. La relación de las absorbancias obtenidas a



260nm y a 280nm ( $\lambda_{260\text{nm}}/\lambda_{280\text{nm}}$ ) proporciona una estimación de la pureza del ADN. Así, una muestra de ADN se considera de una pureza aceptable cuando el valor de dicho cociente se encuentra comprendido entre 1,8 - 2.

### 3.2.5 Ligación del pNOS-3 en el vector pGL4.20

Tras cuantificar el ADN, se procedió a la ligación del fragmento del pNOS-3 en el plásmido pGL4.20 [luc2/Puro], a partir del *TA Cloning Kit*. El cálculo de la cantidad adecuada de ADN correspondiente al fragmento del pNOS-3, necesaria para ser ligado dentro del vector pGL4.20 [luc2/Puro] (50ng), se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$X \text{ ng Inserto} = \frac{(\text{Y pb Inserto}) \times (50 \text{ ng pGL4.20})}{(5.404 \text{ pb del vector pGL4.20})}$$

A continuación, se sometieron a ligación 14,8ng del fragmento del pNOS-3 con 50ng del plásmido linearizado, en presencia de 4 unidades internacionales (U.I) de ligasa del bacteriófago T4. La reacción se llevó a cabo en tampón de ligación 1X (6mM Tris-HCl pH 7,5, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ClNa, 0,1mg/ml BSA, 7mM β-mercaptoetanol, 0,1mM ATP, 2mM ditiotriol (DTT), 1mM espermidina), ajustando con agua estéril hasta un volumen final de 10μl, durante toda la noche y a 14°C. La mezcla para la reacción de ligación se indica en la tabla 6.

**Tabla 6. Mezcla para la reacción de ligación.**

Componentes	Volumen (μl)
Inserto	X
Tampón de Ligación 10X	1
Vector pGL4.20 (50ng/μl)	1
T4 ADN Ligasa (4 UI/μl)	1
H <sub>2</sub> O estéril	Hasta 10μl

### **3.2.6 Cultivo bacteriano. Preparación de medio y placas**

La manipulación de los cultivos bacterianos se realizó en condiciones asépticas para evitar el crecimiento de organismos contaminantes, desarrollándose todo el procedimiento próximo a la llama de un mechero Bunsen. Del mismo modo, el material y el medio de cultivo empleado fueron previamente esterilizados. Tras finalizar su manipulación, la superficie de trabajo se limpió con etanol 70%.

El medio de cultivo bacteriano empleado fue medio líquido de Luria-Bertani (LB). Para su preparación se disolvieron 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl en 1l de agua destilada y se ajustó el pH a 7,0. Tras ser autoclavado y enfriado hasta los 55°C aproximadamente, el medio se conservó a 4° C. Previamente a su uso, se añadió al medio de cultivo 100µg/ml ampicilina como antibiótico de selección positiva.

El LB-agar empleado para cubrir la superficie de las placas de Petri se preparó siguiendo el mismo procedimiento descrito para el medio LB líquido, con la incorporación adicional de 15g/l de agar. Tras la esterilización, y una vez enfriado hasta los 55°C, el medio LB-agar se suplementó 100µg/ml ampicilina. A continuación, se depositaron unos 20ml de LB-agar por placa de Petri de 10 cm, dejándolo solidificar a TA. Finalmente, las placas se almacenaron selladas, a 4°C, de forma invertida y protegidas de la luz, hasta el momento de su uso. Previamente a la siembra de las bacterias, las placas de LB-agar fueron atemperadas a 37°C durante 30min.

### **3.2.7 Transformación bacteriana y selección de clones**

La transformación es el proceso de captación de ADN exógeno desnudo por parte de bacterias competentes, con la finalidad de amplificar el número de copias de la construcción insertada.

El procedimiento consistió en transformar bacterias químicamente competentes de la cepa comercial INVaF<sup>r</sup> de *Escherichia*

*coli* (*One Shot*<sup>®</sup> *chemically competent E.coli*), con la construcción pGL4-NOS3 o con el vector comercial pGL4.20 [luc2/Puro] mediante choque térmico. Dicho tratamiento altera la membrana externa bacteriana aumentando su permeabilidad y facilitando la incorporación de los plásmidos. Para ello, tras descongelar las bacterias competentes (almacenadas a -80°C), una alícuota de 25µl se incubó con 2µl del plásmido pGL4-NOS3 (40,9ng/µl) o del plásmido comercial (25ng/µl) durante 30min en hielo, seguido de un calentamiento a 42°C durante 30s sin agitación y transfiriendo nuevamente los viales al hielo. A continuación, se añadieron 125µl de medio SOC a TA (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub> y 20mM glucosa) y se incubó durante 1h a 37°C en agitación.

Para el proceso de selección de las bacterias transformadas eficazmente con el plásmido de interés, se sembraron 60µl de la solución de transformación obtenida anteriormente, en una placa de Petri conteniendo LB-agar suplementado con 100µg/ml ampicilina. Las placas se depositaron de forma invertida en un incubador termostatzado, a 37°C durante 16-18h. La siembra se realizó con ayuda de un asa de siembra de vidrio, esterilizada previamente en la llama del mechero Bunsen con etanol. Los clones bacterianos crecidos tras el periodo de incubación fueron los que habían incorporado el plásmido que les confería la resistencia a ampicilina. A continuación, se picaron entre 4-6 clones en condiciones de esterilidad y con ayuda de puntas de pipeta, las cuales fueron depositadas en tubos estériles independientes conteniendo 5ml de medio LB suplementado con ampicilina 100µg/ml. Tras incubar dicha solución a 37°C durante 16-18h en agitación y comprobar el crecimiento bacteriano, se procedió a extraer y purificar el ADN plasmídico o a conservar el clon bacteriano de interés. La evaluación del crecimiento bacteriano se realizó mediante espectrofotometría, considerándose óptimo un valor entre 0,48-0,5 a una D.O<sub>550nm</sub>. En caso de no haberse alcanzado ese valor de D.O tras el

periodo de incubación indicado, se prolongó este tiempo hasta alcanzar la densidad deseada.

### **3.2.8 Conservación de los clones bacterianos de interés**

Cuando se optó por la conservación de un clon bacteriano que había alcanzado la D.O óptima de crecimiento en medio LB, éste se congeló en glicerol al 15%. El glicerol actúa como agente citoprotector, protegiendo a las bacterias durante el proceso de congelación. Para ello, se realizaron alícuotas de 0,85ml de la suspensión bacteriana en medio LB y 0,15ml de glicerol al 15%. Los criotubos en los que se realizaron dichas alícuotas fueron conservados y almacenados a -20°C y -80°C, respectivamente. En el caso de ser requeridos para su uso, los clones bacterianos fueron parcialmente descongelados en hielo, raspando la superficie con ayuda de una punta de pipeta estéril antes de su completa descongelación. Finalmente, las bacterias fueron inoculadas en 5ml de medio LB suplementado con 100µg/ml ampicilina, e incubadas a 37°C en agitación durante 16-18h. De nuevo, el crecimiento bacteriano fue comprobado por espectrofotometría.

### **3.2.9 Aislamiento y purificación de ADN plasmídico**

El aislamiento y la purificación de ADN plasmídico en condiciones libres de endotoxinas se realizó mediante del kit comercial *DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit*, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En un primer paso, la suspensión bacteriana fue precipitada mediante centrifugación a 1.700g durante 10min a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, el pellet bacteriano fue tratado secuencialmente con los tampones de resuspensión (conteniendo ARNasa), de lisis (para producir la ruptura bacteriana y permitir la liberación del ADN plasmídico) y de neutralización (para anular la acción del tampón de lisis). A continuación, se centrifugó la muestra a 18.000g durante 10min a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a una columna de

purificación conteniendo una membrana de sílice. La columna se centrifugó y el ADN plasmídico retenido en la membrana se lavó con tampón de lavado para eliminar los restos de endotoxinas bacterianas. Finalmente, el ADN fue recuperado mediante centrifugación, tras depositar en la superficie de la membrana 50µl de tampón de elución. El ADN recuperado fue cuantificado espectrofotométricamente como se indica en el apartado 3.2.4.

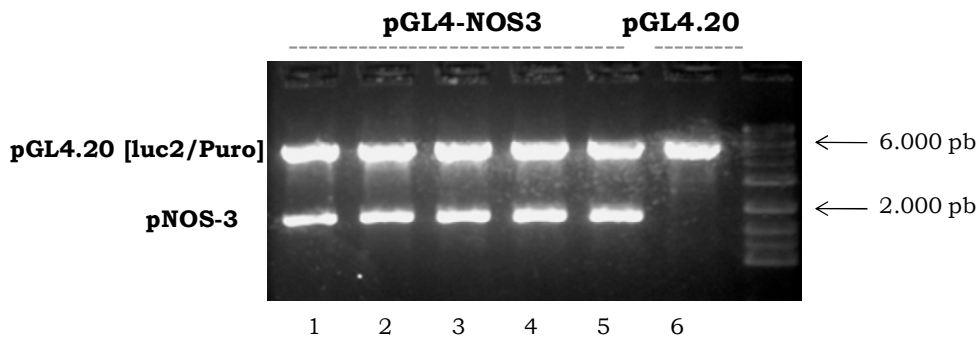
### **3.2.10 Comprobación de la ligación**

El éxito del proceso de ligación se comprobó mediante digestión enzimática del plásmido. Para ello, 2µg de ADN plasmídico extraído de cada uno de los clones seleccionados tras la transfección y siembra, fue digerido (por separado) en presencia de las enzimas de restricción Hind III y Kpn I, de la misma forma en que se relata en el apartado 3.2.2. El producto de la doble digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante el sistema de análisis de imagen LASS 3000 (Fujifilm). El análisis reveló un fragmento entorno al marcador de 6.000pb, correspondiente al vector pGL4.20 [luc2/Puro] (5.404pb), y otro por debajo del marcador de 2.000pb, correspondiente al fragmento del pNOS-3 (1.601pb), en los cinco clones seleccionados a partir de la transfección con la construcción pGL4-NOS3 (calles 1-5). Por otro lado, se observó un fragmento próximo a las 6.000pb, correspondiente al clon portador del vector comercial pGL4.20 [luc2/Puro] sin inserto (calle 6) (Fig.33).

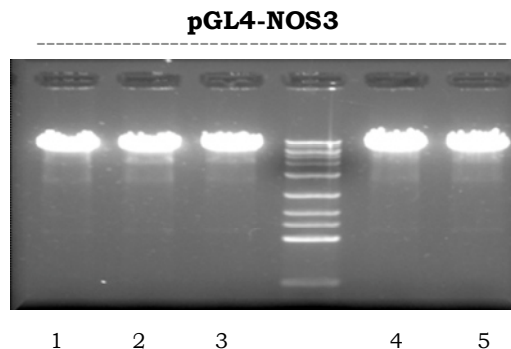
Adicionalmente, fue necesario descartar la existencia de posibles construcciones aberrantes generadas durante el proceso de ligación (múltiples inserciones del fragmento clonado,...). Para ello, el ADN plasmídico de los cinco clones seleccionados como portadores del vector pGL4-NOS3, fueron linearizados mediante digestión simple con la endonucleasa Hind III. Tras separar los productos de digestión mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, se observó la presencia de un único fragmento de unos 7.000pb para todos los clones

seleccionados, correspondiente al tamaño de la construcción pGL4-NOS3 (7.005pb) (calles 1-5) (Fig.34).

**Fig.33. Digestión enzimática doble del plásmido pGL4-NOS3.** La figura muestra un gel de agarosa al 1% donde se separaron los fragmentos de ADN resultantes de la doble digestión de los plásmidos pGL4-NOS3 (extraído de 5 clones individuales) y pGL4.20 con las endonucleasas HindIII y KpnI. Se observan las bandas pertenecientes al fragmento del promotor de NOS-3 (1.601pb) y el plásmido pGL4.20 (5.404pb).



**Fig.34. Digestión del plásmido pGL4-NOS3 con la endonucleasa HindIII.** La linearización del vector pGL4-NOS3 con HindIII dio como resultado una sola banda del tamaño esperado, correspondiente a la ligación del vector pGL4.20 [luc2/Puro] con el fragmento del pNOS-3. Se muestran los cinco clones bacterianos seleccionados, en un gel de agarosa al 1%.



Nuevamente, previo al proceso de transfección celular, fue imprescindible verificar que la secuencia clonada en el vector de trabajo pGL4.20 [luc2/Puro] se correspondía con el ADNc del pNOS-3 humano y continuaba sin tener errores en su secuencia nucleotídica. Para ello,

el plásmido pGL4-NOS3 del clon finalmente elegido (uno de los cinco clones seleccionados) fue secuenciado y sometido a un análisis BLAST, empleando pareja de cebadores universal descrita en el apartado 3.2. de la sección material y métodos. Tras comparar la secuencia de 1.601pb frente a todo el genoma humano, el análisis de alineamiento, reveló un 100% de homología con el pNOS-3 de humano.

### **3.2.11 Transfección celular**

Para desarrollar los ensayos de actividad del promotor de la NOS-3, se utilizó la línea celular HepG2 transfectada de manera estable con el plásmido pGL4-NOS3 ó pGL4.20. La transfección celular es un procedimiento de biología molecular que permite introducir ADN exógeno en una célula. En nuestro caso, utilizamos un método de transfección químico que permite la formación de un complejo entre el reactivo de transfección utilizado y el ADN. En particular, utilizamos el reactivo de transfección FUGENE® 6, el cual se basa en una mezcla de lípidos disuelta en etanol al 80%. Dicho reactivo fue usado en una relación 3,5:1 ( $\mu\text{L}$  Fugene :  $\mu\text{g}$  de ADN), diluido en medio MEM sin SFB. Tras incubar la mezcla entre el reactivo y el ADN plasmídico durante 5min a TA, se añadió la suspensión celular y se incubó a TA durante 30min. A continuación, las células fueron sembradas en frascos de cultivo de  $75\text{cm}^2$ , a una densidad de  $75.000$  células/ $\text{cm}^2$ , y se mantuvieron en cultivo durante 48h. Transcurrido ese tiempo, se inició la selección de las células transfectadas mediante la incorporación del antibiótico puromicina ( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) al medio de cultivo. Trascorrida una semana, la dosis de puromicina se redujo a la mitad ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para el mantenimiento de los clones celulares resultantes. Una vez alcanzado el tamaño adecuado, un total de 13 clones de la línea celular pGL4-NOS3 y 9 clones de la línea celular control pGL4.20 fueron aislados.

### **3.3 Subcultivo de las líneas celulares**

Para realizar un subcultivo de células adherentes, se retiró el medio de cultivo en contacto con las células y éstas se lavaron con PBS (136,8mM NaCl, 1,46mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>K, 2,68mM KCl, 4,29mM HPO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>, pH 7,4) estéril y a 37°C, con objeto de eliminar las proteínas del suero contenido en el medio de cultivo, las cuales inhiben la acción de la tripsina. Posteriormente, y tras retirar el PBS, las células se incubaron con una solución de 0,025% tripsina/0,01% EDTA en PBS (0,066ml/cm<sup>2</sup>), durante 7min a 37°C. Transcurrido ese tiempo y una vez comprobado que las células se habían despegado del frasco, la suspensión celular se pipeteó arriba y abajo repetidas veces con ayuda del pipeteador automático, hasta conseguir disgregar los grumos celulares. A continuación, se incorporó el doble del volumen de medio de cultivo complementado con SFB para inhibir el efecto de la tripsina, se recuperó la suspensión celular en un tubo estéril y se centrifugó a 550g durante 5min a 20°C. Posteriormente, el sobrenadante se decantó y el sedimento de células se resuspendió en el volumen adecuado de medio de cultivo, tomándose una alícuota para realizar el recuento celular. Para la expansión celular, las células fueron subcultivadas a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup>, remplazándose el medio de cultivo a las 24h con objeto de eliminar aquellas células que no se hubiesen adherido a la superficie de la placa/frasco de cultivo utilizado. Todas las soluciones utilizadas para lavar, tripsinizar, centrifugar y cultivar las células fueron precalentadas antes de su uso en un baño de agua a 37°C.

### **3.4 Recuento celular**

El conteo del número de células se realizó en una cámara de Neubauer de líneas claras mediante el método de exclusión del azul tripán. El azul tripán es un colorante azoico que permite diferenciar las células vivas de las muertas: mientras que las células vivas son impermeables a él, el colorante es capaz de acceder al interior de las

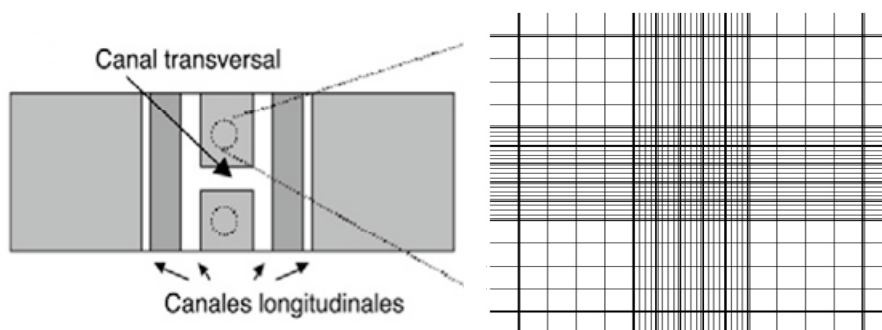


células que presentan rotura de la membrana plasmática y teñir su citoplasma.

El procedimiento consistió en mezclar una alícuota de la suspensión celular con el mismo volumen de la solución de azul tripán. Transcurridos 5min, se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y, a continuación, se depositó una gota de la mezcla anterior que, penetrando por capilaridad, rellenaba el espacio entre la cámara y el cubreobjetos. Finalmente, se procedió al conteo celular con ayuda de un microscopio óptico invertido.

La cámara de Neubauer es un portaobjetos que contiene una depresión central formada por dos cuadrículas grabadas con ayuda de un diamante. En los extremos de las cuadrículas se disponen 4 cuadrantes de 4 x 4 cuadrados cada uno de ellos (Fig.35).

**Fig.35. Esquema de una cámara de Neubauer utilizada para el recuento celular.** En su parte central dispone de dos cuadrículas microscópicas con cuatro áreas de 4x4 cuadrados. El área de cada cuadrante es de  $1 \text{ mm}^2$  y la profundidad de 0,1 mm.



El lado de cada cuadrante mide 1mm, es decir, contiene un área de  $1 \text{ mm}^2$ . La depresión central está hundida 0,1mm respecto a la superficie, por lo que, tras cubrirla con un cubreobjetos, el volumen que entra por capilaridad en la cámara es de  $0,1 \text{ mm}^3$ , es decir  $0,0001 \text{ ml}$  ( $0,1 \mu\text{l}$ ). La concentración de la suspensión celular se calculó contando el número de células dispuestas en los cuatro cuadrantes de las esquinas. Teniendo en cuenta el volumen de cada cuadrante, el número de

cuadrantes contados y la dilución utilizada, el número de células presentes en la suspensión madre viene dado por la siguiente fórmula:

$$\mathbf{N^\circ \text{ células/ml}} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de células contadas}) \times (10.000) \times 2 (\text{factor dilución})}{(\text{n}^\circ \text{ de cuadrantes contados})}$$

### **3.5 Criopreservación y descongelación celular**

Con el fin de minimizar la acumulación de posibles cambios genéticos o para evitar la pérdida accidental de una línea celular por muerte o contaminación, resulta fundamental disponer de un stock de las líneas celulares de interés.

Las células se crecieron en frascos de 75cm<sup>2</sup> hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. En ese momento, las células se tripsinizaron y contaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3 y 3.4. En el caso de la criopreservación, se estableció una densidad de 6 x 10<sup>6</sup> células/ml. Para ello, el sedimento celular se resuspendió en 1ml de medio de congelación, conteniendo un 90% de SFB y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO actúa como agente crioprotector, evitando la formación de cristales de hielo durante la congelación. A continuación, la mezcla se transfirió a un tubo criogénico resistente al N<sub>2</sub> líquido y se introdujo en un contenedor de congelación. Este contenedor posee una cámara externa rellena de isopropanol, el cual favorece el descenso gradual de la temperatura durante el proceso de congelación (aproximadamente, 1°C/min), reduciendo el daño celular por descenso brusco de temperatura. Pasadas 48h, el criotubo se trasladó a un tanque de N<sub>2</sub> líquido (-196°C), donde se conservó hasta su uso, pudiendo permanecer almacenado durante largos periodos de tiempo sin deterioro celular apreciable.

Para la descongelación de los stocks almacenados en N<sub>2</sub> líquido, el contenido del criotubo se descongeló rápidamente en medio de cultivo a 37°C, y se centrifugó a 400g durante 5min a 20°C. Rápidamente, se

retiró el sobrenadante conteniendo el DMSO utilizado como criopreservante, ya que resulta tóxico para las células. Finalmente, el sedimento celular se resuspendió en el volumen adecuado de medio de cultivo y se sembró a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup>. Transcurridas 24h de la siembra, el medio de cultivo fue reemplazado para eliminar las células muertas que no se hubiesen adherido a la superficie del plástico.

### **3.6 Procedimiento experimental. Tratamientos**

Para el desarrollo de los distintos procedimientos experimentales, las células se sembraron en placas aptas para el cultivo celular de 4, 10, 20, 40, 60, ó 100mm de diámetro, a una densidad entre 50.000-150.000 células/cm<sup>2</sup>, en 0,15ml/cm<sup>2</sup> de medio de cultivo MEM sin rojo fenol. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 24h, administrándose 0,5mM GCDCA a las 48h de la puesta en cultivo, como mínimo.

Los antioxidantes N-acetilcisteína (NAC), tetrakis (ácido 4-benzoico) porfirina (MnTBAP; un mimético de la superóxido dismutasa Mn (III)), MitoQ (un derivado de ubiquinona dirigido a la mitocondria a través del catión trifenilfosfonio) y catalasa fueron administrados a 0,5mM, 0,1mg/ml, 1μM y 500 (U/ml), respectivamente. MitoQ fue sintetizado según el procedimiento descrito por Kelso y cols. (Kelso et al., 2001).

La regulación de la producción de ON celular se realizó mediante la administración de L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil éster, 5mM), un inhibidor competitivo de la NOS, o de NONOate ([[(Z)-1-[2-(2-aminoetil)-N-(2-amonioetil) amino] diazen-1-ium-diolato, 0,2mM), un donador de ON.

El papel del calcio (Ca<sup>2+</sup>) se valoró mediante el empleo de EGTA (o ácido tetraacético etilenglicol; 3mM), el ionóforo de Ca<sup>2+</sup> A23187 (0,5μM), y tapsigargina (0,5μM).

La participación de los factores de transcripción en la regulación de la expresión de NOS-3 fue evaluada con ayuda de los inhibidores curcumina (4 $\mu$ M), quercetina (20 $\mu$ M), ácido tolfenámico (60 $\mu$ M), mitramicina A (20nM) y SR 11302 (o ácido E,E,Z,E-3-Metil-7-(4-metilfenil)-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,4,6,8-nonatetraenoico; 10 $\mu$ M y 50 $\mu$ M). Las células se recogieron a distintos tiempos de acuerdo a los parámetros en estudio.

### **3.7 Recogida del medio de cultivo y preparación de los extractos celulares**

A las 72h de la siembra celular, el medio de cultivo se recogió y se centrifugó a 400g durante 5min a 4°C. Posteriormente, se alicuotó y se congeló a -80°C hasta el momento de su uso. En dicho medio extracelular se valoró la actividad enzimática LDH y la acumulación de nitratos y nitritos, como medida indirecta de la producción de óxido nítrico celular.

Para la obtención de los extractos celulares se preparó una solución de lisis no desnaturalizante compuesta por 50mM HEPES pH7,5, 10mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Nonidet NP-40, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 5 $\mu$ g/ml aprotinina y 10 $\mu$ g/ml leupeptina. Tras recuperar el medio de cultivo extracelular, las células adheridas se lavaron con PBS frío y se recogieron en ese mismo tampón con ayuda de un rascador celular. A continuación, fueron centrifugadas a 1700g durante 5min a 4°C, y el sedimento celular resultante se resuspendió en la solución de lisis previamente descrita. Tras incubar 10min en hielo, los extractos celulares se centrifugaron a 18.000g durante 5min a 4°C. El sobrenadante conteniendo el lisado celular total fue alicuotado y congelado a -80°C hasta el momento de su uso. Se reservó una pequeña alícuota para la determinación de la concentración de proteína en la muestra mediante espectrofotometría.

### **3.8 Preparación de los extractos nucleares**

Para la obtención de los extractos nucleares, las células se sembraron en placas de 100mm de diámetro a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup>. Brevemente, tras lavarlas en PBS, las células se recogieron en ese mismo tampón con ayuda de un rascador y se centrifugaron a 21.000g durante 1min a 4°C. A partir de este momento, todos los pasos se hicieron en frío. El pellet celular obtenido se lisó en 400µl de tampón A (10mM HEPES-KOH pH 7,9, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,2mM PMSF) y se incubó en hielo durante 10min con agitación suave cada 3min. Tras centrifugar a 4.000rpm durante 3min, el precipitado nuclear se resuspendió en 80µl de tampón C (20mM HEPES-KOH pH 7,9, 25% glicerol, 0,45M EDTA, 0,42M NaCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM DTT, 0,2mM PMSF) y se incubó 20min en hielo, con agitación suave cada 5min. Finalmente, tras centrifugar la muestra a 18.000g durante 3min, el sobrenadante se alicuotó y se congeló a -80°C hasta el momento de su uso. Se reservó una pequeña alicuota para la determinación de la concentración de proteína en la muestra mediante espectrofotometría.

### **3.9 Crecimiento celular**

#### **3.9.1 Determinación del crecimiento celular por el método de exclusión con azul tripán**

La determinación de la velocidad de crecimiento celular se llevó a cabo mediante la elaboración de la curva de crecimiento, representando el número de células frente al tiempo transcurrido (horas) desde la puesta en cultivo. Además, se calculó el tiempo de duplicación (TD) y la viabilidad celular.

Se emplearon placas de cultivo de 6 pocillos, en los que se sembraron 4x10<sup>5</sup> células/pocillo, en un volumen final de 2ml de medio de cultivo. Para el ensayo, las células se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante cinco días, realizándose el recuento celular cada 24h mediante

el test de exclusión de azul tripán. Así pues, se sembraron tantos pocillos como días durante los que se evaluó la tasa de crecimiento celular, para cada una de las condiciones experimentales sujetas a estudio. Transcurridas 24h de la puesta en cultivo, se realizó el recuento celular correspondiente al tiempo cero horas ( $t_0$ ). En el resto de pocillos, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo con el tratamiento apropiado, estimándose el número de células en los tiempos correspondientes ( $t_{24}$ ,  $t_{48}$ ,  $t_{72}$  y  $t_{96}$ ). El ensayo se realizó por triplicado.

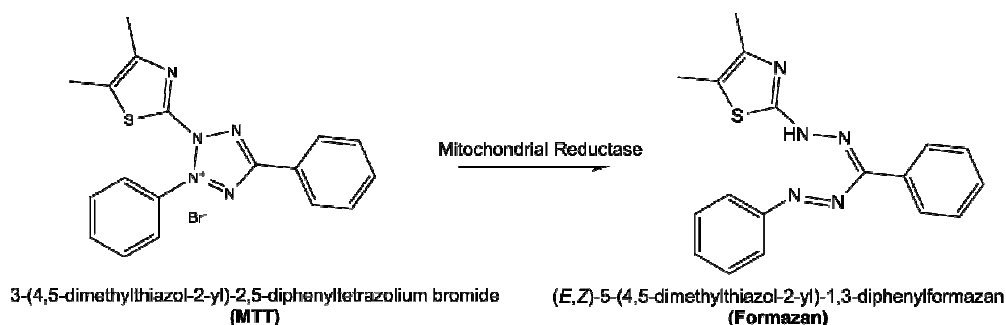
Para cuantificar el número de células muertas acumuladas, el medio de cultivo se retiró y reservó, y las células se lavaron con PBS a 37°C. A continuación, ambos volúmenes se agruparon y se centrifugaron a 700g durante 5min a 20°C, de manera que el pellet resultante se mezcló con el pellet obtenido tras la tripsinización celular. El TD se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$TD = \frac{\text{Tiempo (horas)}}{\text{Ln (n}^\circ \text{ células) / n}^\circ \text{ células a } t_0 \text{) / Ln (2)}}$$

### **3.9.2 Determinación de la proliferación celular mediante el ensayo de MTT**

Como método alternativo, la proliferación celular se determinó mediante el ensayo con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-tizolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium]. Se basa en un método colorimétrico que permite valorar la actividad metabólica celular. Consiste en la reducción del MTT en formazán, un compuesto de color azul, a través de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Así, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Fig.36).

**Fig.36. Reacción de reducción del MTT por la succinato deshidrogenasa.**



El ensayo se realizó en placas de cultivo de 96 pocillos, donde se sembraron 14.300 células/pocillo, en un volumen final de 200 $\mu$ l de medio de cultivo. De manera similar al ensayo anterior, fue necesario sembrar un pocillo/día para cada una de las condiciones experimentales sujetas a estudio, manteniendo las células a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante cinco días y realizando el ensayo cada 24h. Así, transcurridas 24h de la puesta en cultivo, se realizó la medida correspondiente a las células sembradas en los pocillos a tiempo cero horas (t<sub>0</sub>). En el resto de pocillos, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo con el tratamiento correspondiente, realizándose el ensayo a los tiempos correspondientes (t<sub>24</sub>, t<sub>48</sub>, t<sub>72</sub> y t<sub>96</sub>). Para ello, los pocillos se lavaron con 100 $\mu$ l de medio de cultivo MEM sin rojo fenol y sin complementar, y, tras la administración de 50 $\mu$ l de MTT/pocillo (1mg/ml), las células se incubaron durante 2h en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, se retiró cuidadosamente el MTT y el precipitado azul resultante se resuspendió en 100 $\mu$ l de DMSO con ayuda de una pipeta. La absorbancia del formazán diluido en DMSO fue cuantificada espectrofotométricamente en el lector de placas TECAN a una DO<sub>570nm</sub>, con una  $\lambda$  de corregida de 650nm. Para cada día del ensayo se utilizaron, además, pocillos sin células donde se añadió MTT y se completó el protocolo descrito. Estos pocillos fueron utilizados como blancos de referencia, y su valor fue restado de cada una de las

muestras analizadas. El ensayo transcurrió en oscuridad y se realizaron seis réplicas por cada condición experimental.

#### **4. ANIMALES. ESTUDIO**

Para el estudio *in vivo* se utilizaron ratas macho de la raza Wistar de 200-250g de peso de ocho semanas de edad, alimentadas con pienso y con libre acceso a la comida y al agua. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, y con ciclos de 12h luz/oscuridad. Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en las instalaciones acreditadas para tal fin, disponibles en el animalario del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS). Los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo a lo indicado en la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del consejo del 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos y con los protocolos de cuidado y de uso para experimentación del IMIBIC.

##### **4.1 Procedimiento quirúrgico y diseño experimental**

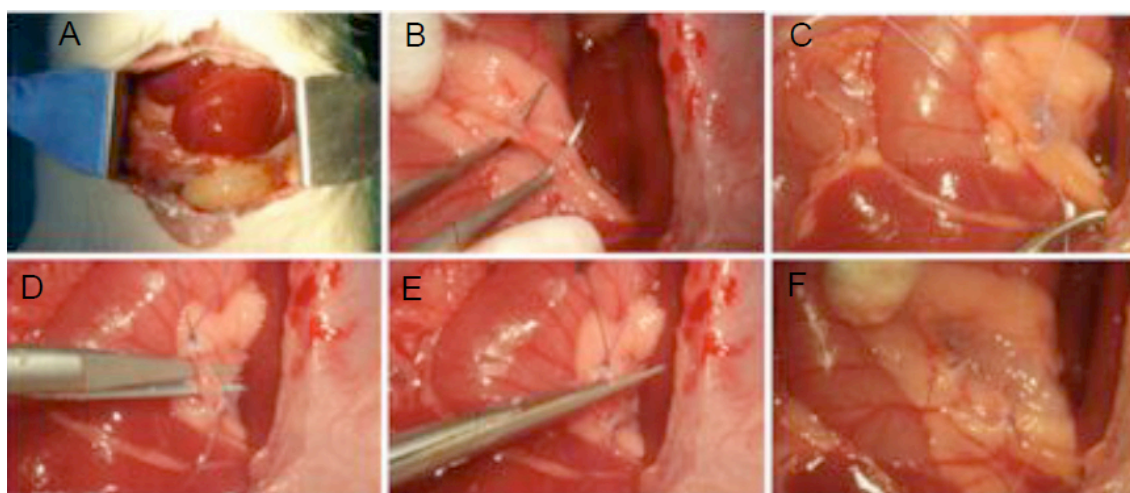
Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia inhalatoria con fluorometil 2,2,2-trifluoro-1 (trifluorometil) etil éter o sevoflurano al 3%. El sevoflurano actúa rápidamente, permitiendo obtener una rápida inducción y recuperación de la anestesia. Su administración se realiza poco a poco, a través de un vaporizador específicamente calibrado, conectado a una bombona de oxígeno que lo vehiculiza. La inducción de la anestesia se realizó introduciendo la rata en una caja cerrada donde únicamente entraba oxígeno con 3% de sevoflurano, quedando así anestesiada en pocos segundos. A continuación, se pesó el animal, se dispuso en posición dorsal con el abdomen rasurado y la zona se desinfectó con una solución de povidona yodada, procediéndose a realizar la laparotomía. El procedimiento para la BDL se inició bajo condiciones de esterilidad, realizando una incisión



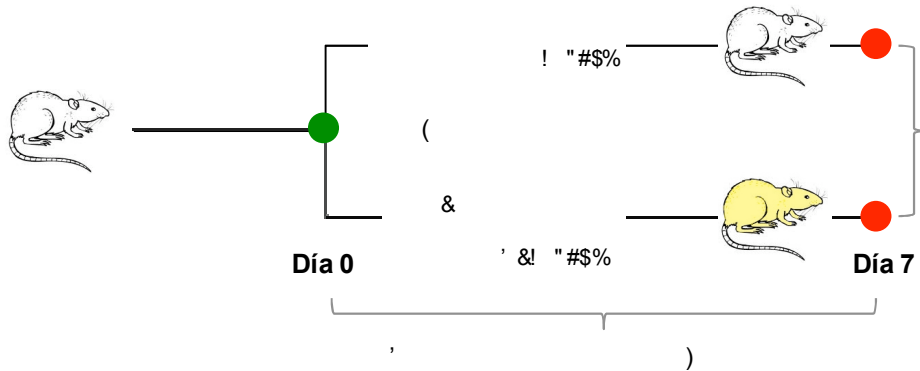
en la línea media ventral y exponiendo el conducto biliar extrahepático. A continuación, se realizó una doble ligadura con sutura de nailon de tipo 5/0 (B. Braun Barcelona) y se seccionó entre ellas el conducto biliar. Finalmente, se procedió al cierre abdominal empleando una ligadura de nailon de tipo 3/0 (Fig.37).

Los animales se distribuyeron en dos grupos de manera aleatorizada: grupo de animales con ligadura del conducto biliar (grupo BDL) (n=13) y grupo de animales con operación simulada (grupo SO o grupo control) (n=13) (Fig.38). Los animales del grupo SO se sometieron a laparotomía y cierre abdominal sin intervención del conducto biliar. Mientras que en este grupo control no murió ningún animal durante el transcurso del experimento, en el grupo BDL se registró una tasa de mortalidad del 35% a partir del quinto día post-cirugía y previamente a la fecha estipulada para el sacrificio animal. Estos animales fallecidos no fueron considerados en el estudio.

**Fig.37. Procedimiento quirúrgico para realizar la ligadura del conducto biliar.** (A) Laparotomía. (B) Localización del conducto biliar extrahepático. (C y D) Doble ligadura con sutura de nailon. (E y F) Sección del conducto biliar. (Imagen extraída con permiso de la tesis doctoral de Laura M. López Sánchez, 2009).



**Fig.38. Esquema representativo del procedimiento experimental.** Los animales del grupo control no fueron sometidos a intervención del conducto biliar. En el grupo BDL se observó muerte a partir del quinto día de la intervención quirúrgica, por lo que la tasa de mortalidad de este grupo al finalizar el experimento (séptimo día de la colestasis) fue del 35%, considerándose únicamente aquellos animales que sobrevivieron a la obstrucción biliar.



## 4.2 Obtención y conservación de las muestras

A los 7 días de la cirugía, los animales se sacrificaron por exsanguinación mediante punción de la arteria aorta abdominal, bajo anestesia inhalatoria de sevoflurano al 3%. La sangre obtenida se depositó inmediatamente en tubos de serología tipo Vacutainer™ que contienen un activador de la coagulación y un gel de polímeros para separar el suero. Los tubos se dejaron reposar durante 45min a 4°C, hasta la formación y retracción del coagulo de sangre. Tras centrifugarlos a 1.500g durante 10min a 4°C., se obtuvo la muestra de suero, la cual fue inmediatamente alicuotada y almacenada a -80°C hasta su uso. Posteriormente, las muestras de suero fueron analizadas para las determinaciones bioquímicas de los niveles circulantes de  $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina transaminasa (ALT) y bilirrubina total (BT) y directa (BD) en Servicio de Análisis Clínicos del HURS.

Tras la obtención de las muestras de sangre, el hígado se perfundió *in situ* con una solución salina de NaCl 9mg/ml a 4°C, a

través de la aorta abdominal, para eliminar los restos de sangre. Posteriormente, se registró el peso del hígado y, a continuación, se escindió y troceó en varias secciones con ayuda de un bisturí estéril. Algunas de las secciones obtenidas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80°C para posteriores análisis. El resto de secciones se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7 para el estudio histológico.

### **4.3 Preparación de los lisados de hígado de rata**

Los lisados hepáticos de rata se obtuvieron por rotura mecánica del tejido con ayuda del *Plus One Sample Grinding kit*, empleando tubos que contienen una resina capaz de disgregar el tejido con ayuda de un micropistilo.

Previamente, los tubos de homogenización se centrifugaron a 14.000g durante 5min a 4°C, para eliminar la solución preservante en donde la resina se encontraba resuspendida. A continuación, se incorporaron 50µl de tampón de lisis frío (composición en la sección 3.7) para humedecer la resina con la solución de trabajo. Posteriormente, los tubos se centrifugaron de nuevo, se retiró el sobrenadante y se conservaron en frío. Tras añadir 100µl de solución de lisis fría a 0,1g de tejido hepático y mezclar con ayuda de un vortex, la muestra se disgregó en frío con un micropistilo acoplado a un rotor con una velocidad de giro de 600rpm. La fricción generada entre el micropistilo, la resina y la pared del tubo favoreció la rotura del tejido. Tras el proceso, y habiendo constatado la homogenización del tejido, los tubos se centrifugaron a 18.000g durante 5min a 4°C y, tras recuperar el sobrenadante, se le añadieron 200µl de tampón de lisis, se mezcló y se alicuotó en tubos que fueron conservados a -80°C hasta su uso. Se reservó una pequeña alícuota para la determinación de la concentración de proteína en la muestra mediante espectrofotometría.

## **5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

La determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo mediante una técnica de cuantificación espectrofotométrica descrita por Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo colorimétrico comercial denominado solución de Bradford. Se trata del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250, de naturaleza ácida, capaz de cambiar de color tras reaccionar con las proteínas presentes en la muestra, formando complejos colorimétricos relativamente estables con un pico de absorbancia a una  $\lambda 595\text{nm}$ . El ambiente ácido que proporcionan las proteínas de la muestra son las responsables del cambio de coloración anaranjada del reactivo hasta una tonalidad azulada, siendo la intensidad del color proporcional a la cantidad de complejo colorante-proteína formado, que a su vez es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

La reacción se llevo a cabo en una placa de 96 pocillos de fondo transparente, en la cual se mezclaron  $20\mu\text{l}$  de muestra y  $180\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford diluido 1/10 en  $\text{H}_2\text{O}$ . Tras incubar 5min a TA y en oscuridad, se cuantificó la concentración de proteína espectrofotométricamente, a una  $\text{DO}595\text{nm}$ . La concentración de proteína de cada muestra se calculó extrapolando los valores de absorbancia en una recta patrón o de calibración, desarrollada con 12 estándares de concentración conocida, empleando BSA ( $1,4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Los valores de absorbancia obtenidos con cada una de las muestras fueron interpolados a la recta de calibrado, obteniéndose así el valor relativo de concentración de proteína total presente en la muestra. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

## **6. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO**

La producción general de EROs se cuantificó empleando las sondas, dihidroetidio (DHE), 2,7 diclorodihidrofluoresceína diacetato

(H<sub>2</sub>DCFDA) y 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacino (ADPH), descritas a continuación:

- El **DHE** (también llamado hidroetidina) es la forma reducida del bromuro de etidio y difunde al interior celular de forma pasiva. En el citosol presenta una fluorescencia azul, pudiendo oxidarse en presencia de EROs hasta 2-hidroxietidio (2-EOH) y etidio. El producto 2-EOH se genera por la oxidación de DHE en presencia de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. No obstante, el DHE también puede reaccionar con OH<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con oxidantes derivados del peroxinitrito, en el citosol.

- La **H<sub>2</sub>DCFDA** es una sonda lipofílica no fluorescente, capaz de difundir libremente a través de la membrana plasmática de las células. Una vez en el citosol, es hidrolizado hasta DCFH, siendo capaz de reaccionar con productos de oxidación como, OH<sup>•</sup>, radicales carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>), radicales tiilos (procedentes de la oxidación de tioles), dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), peroxinitritos y peróxido de hidrógeno, oxidándose rápidamente hasta el producto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF).

- El **ADPH** es una sonda no fluorescente derivada de la dihidroresofurina, que se oxida hasta resofurina en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Wojtala et al., 2014).

Durante el ensayo, las células se incubaron en presencia de 10μM DHE o H<sub>2</sub>DCFDA diluido en medio de cultivo, a 37°C durante 20 ó 30min, respectivamente. El medio de cultivo se retiró y las células se lavaron y mantuvieron en PBS a 37°C, con objeto de eliminar el exceso de sonda. La producción de radicales libres se evaluó *in situ* a través de la fluorescencia emitida por el DHE (λ<sub>ex</sub>510nm/λ<sub>em</sub>590nm) y H<sub>2</sub>DCFDA (λ<sub>ex</sub>500nm/λ<sub>em</sub>520nm), en el lector de placas TECAN. Para los controles negativos, las células fueron incubadas con su correspondiente tratamiento, sin adición de la sonda (DHE o H<sub>2</sub>DCFDA). Los datos se presentaron como U.A relativas x μg<sup>-1</sup> de proteína. El ensayo se desarrolló en oscuridad. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Por otro lado, la cuantificación del estrés oxidativo celular mediante el uso de la sonda ADPH se llevó a cabo con el *Amplex® red Hydrogen Peroxide kit*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Puesto que la sonda ADPH no es capaz de difundir libremente a través de la membrana plasmática, las células se tripsinizaron y sonicaron durante 2min, a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml en PBS frío. Para ello se utilizó un Bioruptor System UCD-200. Tras eliminar los restos celulares por centrifugación ( $10.600g$  durante 5min a  $4^\circ C$ ), el lisado celular se alicuotó y conservó a  $-80^\circ C$  hasta el momento de su uso. Se reservó una pequeña alícuota para la estimación de la concentración de proteína en la muestra. Durante el ensayo,  $50\mu l$  del extracto celular se mezcló con la solución de trabajo compuesta por  $100\mu M$  de ADHP y  $0,2 U/ml$  de peroxidasa de rábano, en una proporción 1:1. Tras 30min de incubación a TA y en oscuridad, se registró el incremento de fluorescencia durante 1h empleando ( $\lambda_{ex}550nm/\lambda_{em}595nm$ ). El ensayo se desarrolló en oscuridad. Los datos se presentaron como  $U.A \times min^{-1} \times mg^{-1}$  de proteína.

## **7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES**

### **7.1 Purificación de mitocondrias**

La actividad de los complejos respiratorios se determinó por espectrofotometría. Para ello, se crecieron entre 6 y 8 placas de cultivo de 100mm de diámetro, con la finalidad de purificar las mitocondrias siguiendo el protocolo descrito por Birch-Machin y Turnbull (Birch-Machin and Turnbull, 2001).

Las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a  $550g$  durante 5min a TA. El precipitado se lavó primero con PBS frío, y después con medio B frío ( $250mM$  sacarosa,  $2mM$  HEPES,  $0,1mM$  EGTA, pH 7,4), centrifugándose a  $550g$  durante 5min a  $4^\circ C$ . A partir de este momento, tanto las células como el tampón se mantuvieron en el hielo durante

todo el proceso de purificación. El sedimento celular resultante se resuspendió en un volumen de 2,2ml de medio B y se transfirió a un contenedor Potter-Elvehjem de vidrio, homogeneizándose la mezcla mediante 10 pases de arriba hacia abajo, a 600rpm, con ayuda de un émbolo-teflón acoplado a un rotor. Tras centrifugar la suspensión a 1.500g durante 6min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a tubos de 1,5ml y el precipitado celular se homogeneizó de nuevo para aumentar la eficiencia del proceso. El sobrenadante obtenido tras la segunda centrifugación se transfirió a nuevos tubos. Estos junto con los anteriores, se centrifugaron a 18.000g durante 6min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 1ml de medio B, centrifugándose a 18.000g durante 10min a 4°C. El pellet final se resuspendió en el volumen adecuado de medio B, dependiendo del volumen del sedimento de mitocondrias obtenido. De forma aproximada, la fracción de mitocondrias obtenida a partir de 6-8 placas de 100mm confluentes, se resuspendió en 200µl de medio B. Finalmente, este volumen se dividió en distintas alícuotas de 20µl (6 tubos) y de 40µl (2 tubos), que se conservaron a -80°C hasta su uso.

## **7.2 Actividad enzimática de los complejos respiratorios**

Todas las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro termostatzado UV-Visible U-3900H (Hitachi, Tokyo, Japan), empleando cubetas de plástico de 1,5ml. Los datos fueron registrados con el Software *UV Solutions 3.0 for U-3900*. Previo a la determinación de la actividad enzimática, las mitocondrias fueron sometidas a un proceso de permeabilización mediante 7 ciclos de congelación-descongelación en N<sub>2</sub> líquido.

La fórmula empleada para el cálculo de las actividades, en UI/1 es la siguiente:

$$\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times 10^3 (\mu\text{M}/\text{mM}) \times \text{dilución}}{\epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times L (\text{cm})}$$

- $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ : Incremento de la absorbancia por minuto.
- $\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar del reactivo iniciador de la reacción, que absorbe a la  $\lambda$  de trabajo y cuya concentración varía durante el transcurso de la reacción.
- L: Anchura del paso de luz (1cm).
- U.I: micromoles de sustrato transformados en un minuto.

### **7.2.1 Actividad NADH-deshidrogenasa sensible a rotenona o complejo I**

La actividad del complejo I (CI) se midió como la disminución de la absorbancia a 340nm que se produce debido a la oxidación del NADH ( $\epsilon=6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por parte de la preparación mitocondrial. Para descartar la acción de otras NADH deshidrogenasas, la muestra se inhibió con rotenona, registrándose la disminución de su absorbancia. En este caso, el  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  es igual a la diferencia entre las actividades en ausencia y presencia de rotenona ( $(\Delta\text{Abs}/\text{minuto})_{\text{CI}} = (\Delta\text{Abs}/\text{minuto})_1 - (\Delta\text{Abs}/\text{minuto})_{\text{rot}}$ ). La medida se registró durante 4min a 30°C.

#### **Preparación de los reactivos:**

- Tampón C1/C2: 25mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 3mM KCN, 2,5 mg/ml BSA. Ajustar el pH a 7,4.
- NADH 13 mM: 46mg en 5ml de  $\text{H}_2\text{O}$  (fresco).
- Coenzima  $\text{Q}_{10}$ , ubiquinona o UQ1 10mM en etanol.
- Antimicina A 1mg/ml en etanol.
- Rotenona 500 $\mu\text{M}$  en etanol.

**Preparación de la muestra:** Se tomó una alícuota de 40 $\mu\text{l}$  de la suspensión de mitocondrias purificadas, a la que se añadió 160 $\mu\text{l}$  de tampón C1/C2. Tras incubar 5min a  $T^a$  ambiente, la mezcla se centrifugó a 18.000g durante 5min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se resuspendió en 80 $\mu\text{l}$  de tampón C1/C2 y se incubó 5min a  $T^a$  ambiente. Finalmente, la fracción mitocondrial se sometió a congelación-descongelación.



**Reacción:** Se añadieron, en este orden, los siguientes reactivos:

Reactivo	Stock	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Buffer C1/C2	1X	968	~ 1X
UQ <sub>1</sub>	10mM	13	0,13mM
NADH	13mM	10	0,13mM
Antimicina A	1mg/ml	2	2 $\mu$ g/ml
Muestra	-	7	-

Tras registrar la disminución de la absorbancia durante 4min, se añadieron 6 $\mu$ l de rotenona 500  $\mu$ M, se incubó la mezcla durante 2min a 30°C y se registró la disminución de la absorbancia a 340nm.

### 7.2.2 Actividad succinato deshidrogenasa o complejo II

La actividad del complejo II (CII) se midió como el incremento de la absorbancia a 600nm, producido por la reducción del 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP) ( $\epsilon=19.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en la preparación mitocondrial. La actividad se registró durante 4min a una temperatura de 30°C.

#### Preparación de los reactivos:

- Tampón C1/C2.
- DCPIP 5mM.
- Succinato sódico dibásico 1M.
- UQ1 10mM en etanol.
- Antimicina A 1mg/ml en etanol.
- Rotenona 500 $\mu$ M en etanol.

**Preparación de la muestra:** La muestra se preparó siguiendo el mismo procedimiento del apartado anterior.

**Reacción:** Se añadieron, en este orden, los siguientes reactivos:

Reactivo	Stock	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Buffer C1/C2	1X	952	~ 1X
Succinato	1M	10	10mM
Muestra	-	7	-

A continuación, se incubó 10min a 30°C y se añadió:

Reactivo	Stock	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Rotenona	500 $\mu$ M	10	5 $\mu$ M
Antimicina	1mg/ml	2	2 $\mu$ g/ml
DCPIP	5mM	6	0,03mM

Tras incubar 2min a 30°C, se añadieron 13 $\mu$ l de UQ<sub>1</sub>10mM y se registró la actividad enzimática durante 4min a 600nm.

### 7.2.3 Actividad Citocromo c Oxidasa o complejo IV

La actividad citocromo c oxidasa se determinó como la disminución de absorbancia a 550nm debido a la oxidación del citocromo c reducido ( $\epsilon=21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La reacción se registró durante 2min a 38°C.

#### Preparación de los reactivos:

- Tampón KP 100mM pH 7: Para preparar 100ml de tampón, se añadieron 38,5ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM y se completó el volumen con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, ajustando el pH.

- Citocromo c reducido 1% (10mg/ml, FRESCO): Para preparar 1-1,5ml, se pesó entre 10 y 15mg de citocromo c y se resuspendió en tampón KP 10mM pH 7. Para reducir el citocromo, se añadió una punta de espátula de NaBH<sub>4</sub>, se agitó y se mantuvo en hielo 30min. El pH se ajustó a 7-7,3 con HCl 1N y se completó hasta el volumen requerido con agua destilada. La solución se mantuvo en hielo durante el ensayo.

**Preparación de la muestra:** La muestra no requirió dilución alguna, únicamente fue sometida a congelación-descongelación.

**Reacción:** El orden de adición de reactivos se indica a continuación:

Reactivo	Stock	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
H <sub>2</sub> O destilada	-	795	-
Tampón KP	100mM	100	10mM
Muestra	-	5	-
Cit. C red. 1%	10mg/ml	100	1mg/ml

La actividad enzimática se registró durante 2min a 550nm.

#### 7.2.4 Actividad combinada del CI+CIII

La actividad de los complejos I+III se determinó como el aumento de la absorbancia a 550nm ( $\epsilon = 21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), debido a la reducción del citocromo c tras añadir NADH como sustrato de la reacción. La reacción se llevó a cabo durante 2min a 30°C.

**Preparación de los reactivos:**

- Tampón C1/C2.
- KCN 10mM.
- Citocromo c oxidado 1mM en H<sub>2</sub>O (12,4mg/ml, FRESCO).
- NADH 1mM en H<sub>2</sub>O (0,71mg/ml, FRESCO).

**Preparación de la muestra:** La muestra se diluyó dos veces en el tampón de medida y se sometió a congelación-descongelación.

**Reacción:** La actividad se determinó tras la adición de los reactivos:

Reactivo	Stock	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Buffer C1/C2	1X	745	~ 1X
KCN	10mM	50	0,2mM
Cit. C oxid.	1mM	100	0,1mM
NADH	1mM	100	0,1mM
Muestra	-	5	-

La reacción fue inhibida opcionalmente con 10µl de Antimicina A (1mg/ml en etanol), incubando la mezcla durante 3min a 30°C antes de iniciar el registro de la actividad.

### 7.2.5 Actividad CII+CIII.

La actividad de los complejos II+III se determinó de forma similar a la de los complejos I+III, siguiendo la reducción del citocromo c como un aumento de la absorbancia a 550nm ( $\epsilon = 21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), tras la adición de succinato como sustrato. Para que la actividad registrada represente exclusivamente a la actividad II+III, fue necesario inhibir el complejo I con rotenona. La reacción se llevó a cabo durante 2min a 30°C.

#### Preparación de los reactivos:

- Tampón C1/C2.
- KCN 10mM.
- Citocromo c oxidado 1mM en H<sub>2</sub>O (12,4mg/ml, FRESCO).
- Succinato, 30mM en H<sub>2</sub>O: 8,1mg/ml.
- Rotenona 500µM en etanol.

**Preparación de la muestra:** La muestra se diluyó dos veces en el tampón de medida y se sometió a congelación-descongelación.

**Reacción:** La actividad combinada de los complejos II+III se determinó tras la adición de los siguientes reactivos:

Reactivo	Stock	Volumen (µl)	Concentración final
Buffer C1/C2	1X	735	~ 1X
KCN	10mM	50	0,2mM
Cit. C oxidado	1mM	100	0,1mM
Rotenona	500µM	10	5µM
Muestra	-	5	-
Succinato	30mM	100	3mM

La inhibición con Antimicina A se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior.

### 7.2.6 Actividad Citrato sintasa

La actividad citrato sintasa (CS) se midió a través del incremento de la absorbancia a 412nm, producido por la aparición de la forma aniónica del ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB;  $\epsilon=13,6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) tras añadir oxalacetato (OAA) como iniciador de la reacción. La medida se lleva a cabo a 30°C durante 2min.

#### Preparación de los reactivos:

- Tampón de medida: Tris-HCl 10mM pH=8.
- Acetil Coenzima A: 7mg/ml.
- DTNB 1mM: 2mg en 5ml de tampón de medida (FRESCO).  
Oxalacetato 50mM (OAA): 33mg en 5 de agua (FRESCO).
- Tritón X-100: 10%, 1ml en 10ml de agua.

**Preparación de la muestra:** La muestra se diluyó cinco veces en el tampón de medida y se sometió a congelación-descongelación.

**Reacción:** La actividad citrato sintasa se determinó tras la adición de los siguientes reactivos al medio de reacción:

Reactivo	Stock	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final
Tris-HCl 10mM	10mM	861,7	~10mM
Acetil-CoA	7mg/ml	3,3	0,023mg/ml
DTNBT	1mM	100	0,1mM
Muestra	-	20	-
Tritón-X	10%	10	0,1%
OAA	50mM	5	0,25mM

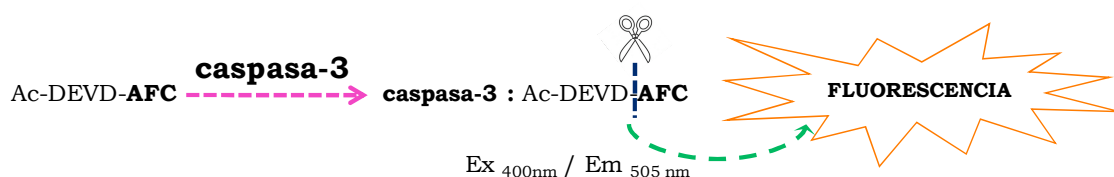
## 8. ANALISIS DE LA MUERTE CELULAR

### 8.1 Muerte celular por apoptosis

La muerte celular por apoptosis se valoró en los extractos celulares obtenidos a partir de los cultivos celulares y del homogenado del tejido hepático de las ratas incluidas en el estudio *in vivo*. Para ello, se cuantificó la actividad proteolítica de la caspasa-3 (Cisteinil-ASPartato-proteASA), conocida por ser una de las caspasas efectoras o ejecutoras responsables de desencadenar las últimas fases del proceso apoptótico, en presencia del sustrato comercial N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometil coumarina (Ac-DEVD-AFC). Dicho sustrato es un oligopéptido de reconocimiento específico para la caspasa-3, que se encuentra unido mediante un enlace peptídico a una molécula que en estado libre puede ser cuantificada espectrofluorométricamente.

La reacción se desarrolló en presencia de 100 $\mu$ M Ac-DEVD-AFC (12,5 $\mu$ l), 50 $\mu$ l de tampón de incubación de caspasa (50mM HEPES pH 7,5, 100mM NaCl, 10% sacarosa, 0,1% 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1 propansulfonato (CHAPS), 1mM EDTA y 5mM de ditioneitol (DTT) y 100 $\mu$ g de muestra, en un volumen final de 100 $\mu$ l. La actividad caspasa-3 se registró durante 2h a 37°C, en el lector de placas TECAN, a través del incremento de fluorescencia emitida como consecuencia de la liberación de la molécula de AFC ( $\lambda_{ex}$ 400nm/ $\lambda_{em}$ 505nm) (Fig.39). Todo el ensayo se desarrolló en oscuridad y todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Los datos se presentaron como U.A x h<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> de proteína.

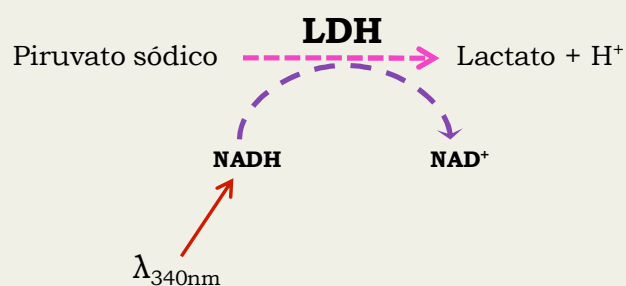
**Fig.39. Reacción de la caspasa-3.** La actividad de la caspasa-3 se valoró a través del incremento de fluorescencia emitida tras la liberación de la molécula AFC.



## 8.2 Muerte celular por necrosis.

La LDH es una enzima oxidorreductasa constitutiva, cuya liberación al medio extracelular se utiliza como marcador de necrosis celular. La LDH cataliza la reducción del piruvato a lactato, con oxidación del coenzima NADH hasta NAD<sup>+</sup>. La LDH presente en el extracto celular (5μl) o en el medio de cultivo (130μl) se determinó en presencia de 0,4mM piruvato sódico y 0,2mM β-NADH, diluido en PBS hasta un volumen final de 200μl. La concentración de LDH presente en la muestra es proporcional al consumo de NADH (Fig.40). Por tanto, durante el ensayo se valoró la oxidación de NADH a través del descenso lineal de la absorbancia a una  $\lambda_{340\text{ nm}}$ . La reacción fue monitorizada durante 4 ciclos de 1min en el lector de placas TECAN, a TA y en oscuridad. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

**Fig.40. Reacción de la lactato deshidrogenasa (LDH).** La oxidación del NADH es proporcional a la cantidad de LDH presente en la muestra.



Para la estandarización de los resultados se utilizó un suero comercial o calibrador, con el que se definieron las unidades de actividad enzimática de LDH presente en la muestra. El calibrador es una preparación de referencia obtenido a partir de suero humano, conteniendo para cada lote un valor de concentración estándar de LDH. La concentración de LDH en el calibrador era de 242,5 U.I/1. De esta forma, comparando el valor de absorbancia de la preparación de referencia con el de la muestra problema, es posible conocer la concentración de LDH en dicha muestra. Los resultados se presentaron como porcentaje de liberación de LDH, aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{LDH del medio de cultivo (U.I/l)}}{\text{LDH citoplasma (U.I/l)+LDH medio de cultivo (U.I/l)+LDH}} \times 100$$

## **9. ESTUDIO CINÉTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR**

El estudio cinético de la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) se realizó en tiempo real, sobre células individuales, mediante el indicador o sonda de  $Ca^{2+}$  denominado Fluo-4 acetoximetil éster (Fluo-4-AM). Este reactivo es utilizado para evaluar la concentración citosólica de iones  $Ca^{2+}$ . Contiene un grupo AM que le permite atravesar la membrana plasmática, favoreciendo su difusión al interior celular. Una vez que la sonda reacciona con el  $Ca^{2+}$ , las esterasas intracelulares catalizan la hidrólisis del enlace acetoximetil éster y la sonda emite fluorescencia verde. Fluo-4-AM puede ser utilizado para medir la  $[Ca^{2+}]$  citosólica en cultivos de hepatocitos mediante microscopía de video digitalizada. Para el desarrollo del procedimiento, las células HepG2 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de 30mm<sup>2</sup> de diámetro, con fondo de vidrio de 10mm<sup>2</sup>, renovándose el medio de cultivo cada 24h. En el momento del ensayo, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo MEM sin rojo fenol y sin complementar, se añadió 2,5µM Fluo-4-AM y 0,02% ácido plurónico (Pluronic-F127) diluido en DMSO (v/v) y se incubó durante 30min en la estufa de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró la mezcla y las células se lavaron con PBS para eliminar el excedente de sonda no incorporada, evitándose así posibles interferencias durante el ensayo.

La medida de la dinámica de la  $[Ca^{2+}]_i$  se valoró en células independientes (30-35 células aproximadamente/placa) previamente seleccionadas, a través de la fluorescencia emitida por la sonda a una  $\lambda_{ex}488nm/ \lambda_{em}543nm$ , en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-E acoplado a una cámara Hamamatsu ORCA II BT y



utilizando el objetivo de 40X. La señal de fluorescencia se registró y fue procesada con el software *MetaFluor Imaging Corporation* (West Chester). Durante el transcurso de la cinética, el registro de la fluorescencia se realizó cada 5s, de manera que los registros obtenidos durante los primeros 30-40s corresponden a la situación basal. Los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por la administración de los diferentes tratamientos experimentales se monitorizaron durante 3-4min aproximadamente.

Los resultados de la cinética de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a los distintos tratamientos se presentaron en % respecto a la situación basal antes de añadir dicho tratamiento, sustrayendo los valores de fluorescencia generados por el ruido de fondo. Los datos se representaron como la variación del % de fluorescencia (unidades arbitrarias, U.A) frente al tiempo y se realizó el cálculo de la pendiente en la situación basal e inmediatamente antes y después de la adición de cada compuesto.

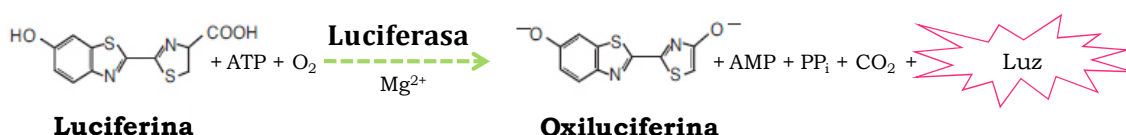
## **10. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE LA NOS-3**

El estudio de la regulación transcripcional acoplada a la expresión de un gen reportero se utiliza de manera rutinaria para el estudio de una gran variedad de eventos fisiopatológicos. La luciferasa de luciérnaga es una enzima oxidativa, implicada en una reacción que libera luz. No requiere modificación postraduccional para ser funcional, y ello le ha permitido ser ampliamente utilizado como gen reportero.

Para los ensayos de actividad del pNOS-3, las células de la línea pGL4.20 y pGL4-NOS3 se crecieron en microplacas de cultivo de 384 pocillos con aislamiento lumínico y fondo transparente, a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup>. La actividad luciferasa se valoró con ayuda del kit comercial *One-Glow™ Luciferasa Assay System*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El lisado celular para valorar la

actividad luciferasa se obtuvo tras añadir 20µl de tampón de lisis 1X a cada pocillo, incubándose en oscuridad durante 5min. El ensayo se desarrolló a TA, siendo registrada la señal de luminiscencia en el lector de placas TECAN. Todas las determinaciones se hicieron por cuadruplicado. Los resultados se presentaron como unidades arbitrarias (U.A) x µg<sup>-1</sup> proteína. La reacción desarrollada durante el ensayo se indica en la Fig.41.

**Fig.41. Actividad luciferasa.** La mono-oxigenación de la luciferina está catalizada por la luciferasa en presencia de magnesio y ATP como cofactor.



Con la finalidad de seleccionar el clon de trabajo con la mejor señal de luminiscencia, realizamos un ensayo de actividad luciferasa previo donde incluimos todos los clones individuales aislados así como el *pool* de clones de ambas líneas celulares. De este modo, mientras que el *pool* celular y los clones seleccionados de la línea pGL4-NOS3 mostraron una elevada actividad luciferasa, no se observó señal de luminiscencia en los clones aislados de la línea control pGL4.20. Tras el análisis fueron seleccionados para los procedimientos experimentales los clones 12 y 9 de las líneas celulares pGL4.20 control y pGL4-NOS3, respectivamente.

## 11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### 11.1 Aislamiento del ARN total

La extracción del ARN celular total se basó en el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987) (Chomczynski and Sacchi, 1987). Tras retirar el medio de cultivo de las placas y lavar con PBS frío, las células se lisaron en presencia de la solución de lisis comercial TRIsure®

compuesto por una mezcla monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para el aislamiento del ARN procedente del tejido hepático de rata se empleó el *Plus One sample Grinding Kit*, siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 4.3 para la obtención de los lisados hepáticos pero homogeneizando el tejido en TRIsure® (0,1g/ml). Tras completar la lisis, se añadió cloroformo en proporción 1:5 al volumen lisado y se mezcló mediante agitación mecánica durante 15s, dejando reposar la muestra 2-3min a TA. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 12.000g durante 15min a 4°C, separándose dos fases: una fase superior acuosa, conteniendo el ARN total disuelto, y una fase orgánica o fenólica inferior. Entre ambas se encontraba una interfase bien diferenciada, conteniendo las proteínas celulares concentradas (Fig.42). Tras recoger la fase acuosa con ayuda de una pipeta estéril y mezclarla con un mismo volumen de isopropanol durante 10min a TA, el ARN se precipitó mediante centrifugación a 12.000g durante 15min a 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se lavó el sedimento de ARN con etanol frío al 75% y se centrifugó a 7.600g durante 10min a 4°C. Con la finalidad de evaporar cualquier resto de etanol, el pellet resultante se dejó secar durante 20min a TA y, a continuación, se resuspendió en agua libre de ARNasas y ADNasas y se incubó a 55°C con agitación durante 10min, para una mejor disolución del ARN.

**Fig.42. Extracción de ARN total.**

Durante la extracción del ARN total con Trisure®, se obtiene una fase acuosa superior (contiene el ARN soluble en cloroformo), una fase orgánica inferior (restos fenólicos) y una interfase bien diferenciada (restos de proteínas). La precipitación del ARN se realizó en presencia de isopropanol.



## 11.2 Tratamiento con ADNasa

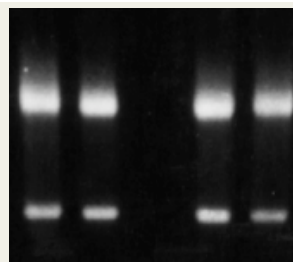
Durante el proceso de extracción de ARN, la mayor parte del ADN es eliminado. Sin embargo, el empleo de técnicas tan sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) requiere la completa eliminación del ADN. Por tanto, para eliminar la posible contaminación con ADN genómico y, evitar amplificaciones inespecíficas durante la qRT-PCR, el ARN total fue sometido a un tratamiento con la enzima desoxirribonucleasa I (ADNasa I). Las ADNAsas son endonucleasas capaces de digerir el ADN de cadena sencilla y doble.

Previamente al tratamiento con ADNasa, el ARN se cuantificó en el espectrofotómetro de igual manera a la descrita en el apartado 3.2.4 para el ADN, pero considerando que 1 unidad de  $DO_{260nm}$  corresponde aproximadamente a 40 $\mu$ g/ml de ARN total. A continuación, la muestra se trató con ADNasa I (1U/ $\mu$ g de ARN en buffer de reacción 1X hasta completar un volumen final de 10 $\mu$ l con agua libre de ARNasas y ADNAsas) a 37°C durante 30min. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo por inactivación de la ADNasa, incubando la muestra a 65°C durante 10min en una solución de EGTA 2mM.

Finalmente, el ARN se cuantificó de nuevo, valorándose la pureza o calidad de la muestra. Así, valores cercanos a 2 para el cociente entre  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  fueron considerados como aptos. Cuando dicho valor se encontraba fuera del rango 1.8-2.0, las muestras fueron descartadas por posible contaminación por proteínas o restos fenólicos empleados durante la fase de extracción. Asimismo, se valoró la integridad del ARN mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, en tampón TBE y 0,5 $\mu$ g/ml bromuro de etidio (apartado 3.2.3). La muestra se preparó mezclando 3-4 $\mu$ g de ARN con 1/3 del volumen de tampón de carga LB. Posteriormente, se incubó durante 5min a 65°C, se enfrió rápidamente en hielo y se cargó en el gel. La electroforesis se desarrolló a 50V constantes, durante 1h aproximadamente. Una muestra de ARN

intacto debe observarse en el gel como una doble banda correspondiente a los ARN ribosómicos 28S y 18S. La proporción 2:1 (28S:18S) en intensidad bajo una fuente de luz U.V es un indicador de que el ARN está íntegro (Fig.43). El ARN parcialmente degradado se observará como un patrón difuso y no presentará una buena intensidad de bandas o no guardará la proporción 2:1. A su vez, el ARN totalmente degradado se presenta como una mancha de muy bajo peso molecular.

**Fig.43. Imagen representativa de la integridad del ARN total.** Electroforesis en un gel de acrilamida al 1% del ARN total, mostrando dos bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 28S y 18S.



### 11.3 PCR cuantitativa en tiempo real

La qRT-PCR es una variante de la PCR a tiempo final que permite la amplificación de una pequeña cantidad de moléculas de ARNm con gran especificidad, a partir de la transcripción reversa del ARNm a ADN copia (ADNc), que posteriormente es amplificado. La qRT-PCR permite simultáneamente amplificar y cuantificar el producto de amplificación a partir de su temperatura de fusión o de *melting* ( $T_m$ ), empleando técnicas de fluorescencia. La cuantificación de la cantidad inicial de ácidos nucleicos en una muestra se consigue mediante la medida del incremento de fluorescencia durante la fase exponencial de la PCR, realizando medidas en cada ciclo de amplificación. El número de copias de la diana al inicio de la reacción puede ser cuantificado durante la qRT-PCR basándose en el ciclo umbral ( $C_t$ ), que se define como el número de ciclos necesarios para que se produzca un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base, siendo inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.  $C_t$  es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias iniciales y, por tanto, a menor valor de  $C_t$ , mayor cantidad de moléculas

iniciales. La información cuantitativa basada en el Ct es más exacta que la técnica de PCR a tiempo final, ya que se basa en las medidas registradas a lo largo de la fase exponencial de la amplificación, cuando la eficiencia de la PCR todavía no se ha visto afectada por la limitación de los reactivos. Tras el ciclo de amplificación, el ADN sintetizado y el ADN molde se unen por complementariedad de bases. La  $T_m$  es la temperatura necesaria para separar este ADN bicatenario. La  $T_m$  de un fragmento de ADN bicatenario queda monitorizada como el decaimiento de la señal de fluorescencia, debido a que la fusión es dependiente de la  $T_m$  del fragmento, que a su vez va depender de la longitud y del contenido en Guaninas+Citosinas (G+C) del fragmento. Por tanto, por cada producto amplificado se obtendrá una curva de temperatura, permitiendo así diferenciarlos entre sí a partir de su  $T_m$ .

El fluoróforo empleado para el desarrollo de la reacción fue SYBR® Green, el cual se une con gran afinidad al surco menor del ADN bicatenario sintetizado en cada ciclo de amplificación, emitiendo una señal de fluorescencia proporcional a la concentración de ADN y permitiendo diferenciar entre amplificados con diferentes  $T_m$ . El SYBR® Green se une proporcionalmente al número de moléculas de doble cadena (no de simple) tras cada ciclo de amplificación, obteniéndose como resultado un incremento de la fluorescencia.

La técnica de cuantificación relativa se basa en la comparación de los niveles de expresión del gen problema con los de un gen constitutivo de referencia o *housekeeping*. Por ello, es fundamental la elección de dicho gen: debe tener una expresión constitutiva, que no se vea afectada por las diferentes condiciones experimentales. Comparando el valor de Ct del gen de referencia con el del gen problema en muestras tratadas y sin tratar, se pueden determinar los cambios relativos de expresión del gen problema.

### 11.3.1 Reacción de la qRT-PCR

El proceso de retrotranscripción (paso de ARNm a ADNc) y amplificación se realizó en una misma reacción mediante el empleo del *QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kit*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción se desarrolló en un volumen final de 10µl, a partir de 50ng de ARN diluido en una mezcla de reacción conteniendo transcriptasas reversas, ADN polimerasa, una mezcla de deoxinucleótidos y el fluorocromo SYBRGreen, en el tampón adecuado. A esta mezcla se le añadieron los oligonucleótidos específicos para la amplificación del ARNm (ADNc) diana, y se completó hasta el volumen final de 10µl con agua libre en ARNasa y ADNasa, cuando fue necesario. En las tablas siguientes se resumen los diferentes oligos o cebadores utilizados para la amplificación de los genes humanos (Tabla 7) y de rata (Tabla 8) de interés.

Para el control negativo de la reacción de PCR, la muestra de ARNm fue sustituida por agua libre de ARNasa y ADNasa, descartándose así posibles amplificaciones por contaminación de los reactivos. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado en placas de PCR de 96 pocillos, empleando el termociclador LightCycler 480. En la Tabla 9 se especifican las condiciones utilizadas en el programa simultáneo de retro-transcripción y amplificación.

**Tabla 7. Lista de cebadores humanos usados para qRT-PCR.**

Cebadores	Gen	Posición	Secuencia (5' - 3')
<b>hNos3-qF</b>	NOS3	3697-3719	AGGGCGACATGGAGCTGGACGAG
<b>hNos3-qR</b>	NM_000603.4	3873-3895	GTGTCTGAGCCGGGAGGGTCGAA
<b>hGPx4-qF</b>	GPX4	403-422	CCTTCCCGTGTAACCAGTTC
<b>hGPx4-qR</b>	NM_002085.3	587-609	ACTTGGTGAAGTTCCAATTGATG
<b>hCat-qF</b>	CAT	1028-1053	TGGTAAACTGGTCTTAAACCGGAATC

<b>hCat-qR#</b>		1159-1179	GGCGGTGAGTGTTCAGGATAGG
<b>hSod1-qF</b>	SOD1	430-451	TGTGGCCGATGTGTCTATTGAA
<b>hSod1-qR</b>	NM_000454.4	519-539	CACCTTTGCCCAAGTCATCTG
<b>hSod2-qF</b>	SOD2	708-728	GGGAGCACGCTTACTACCTTC
<b>hSod2-qR</b>	NM_001024465.1	845-867	TCTTGCTGGGATCATTAGGGTAT
<b>hRpl13A-qF</b>	RPL13A	541-563	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA
<b>hRpl13A-qR</b>	NM_012423.3	642-666	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA

**Tabla 8. Lista de cebadores de rata usados para qRT-PCR.**

Cebadores	Gen	Posición	Secuencia (5' - 3')
<b>rNos3-qF</b>	Nos3	3274-3293	CTGGCAGCCCTAAGACCTAT
<b>rNos3-qR</b>	XM_006235872.1	3355-3375	CGCAGACAAACATGTGTCCTT
<b>rGpx1-qF</b>	Gpx1	312-332	GGAGAATGGCAAGAATGAAGA
<b>rGpx1-pR#</b>	NM_030826.3	433-450	CCGCAGGAAGGTAAAGAG
<b>rGpx4-qF</b>	Gpx4	542-561	CCGGCTACAATGTCAGGTTT
<b>rGpx4-qR#</b>	NM_001039849.2	688-707	ACGCAGCCGTTCTTATCAAT
<b>rCat-qF</b>	Cat	1631-1654	ACAACCTCCAGAAGCCTAAGAATG
<b>rCat-qR</b>	NM_012520.2	1686-1706	GCTTTTCCCTTGGCAGCTATG
<b>rSod1-qF</b>	Sod1	219-237	CGAGCATGGGTTCATGTC
<b>rSod1-qR</b>	NM_017050.1	299-319	CTGGACCGCCATGTTTCTTAG
<b>rSod2-qF</b>	Sod2	226-245	AGCTGCACCACAGCAAGCAC
<b>rSod2-qR</b>	NM_017051.2	397-416	TCCACCACCCTTAGGGCTCA
<b>rHrpt1-qF</b>	Hrpt1	179-203	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC
<b>rHrpt1-qR</b>	NM_012583.2	277-301	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC



**Tabla 9. Protocolo para el análisis de la expresión génica por qRT-PCR.** (\*) La temperatura de hibridación de los cebadores varía según su secuencia.

Programa	Temperatura (°C)	Tiempo	Pendiente (°C/seg)	Adquisición fluorescencia	
Síntesis de ADNc	55	20 min	20	No	1 ciclo
Activación	95	15 min			Simple
Amplificación	Desnaturalización	15 seg		20	
	Hibridación*	15 seg			
	Extensión	20 seg		Continuo	1 ciclo
Curva de fusión	Desnaturalización	1 seg	0,1	Continuo	
	Unión del Syber G.	15 seg			
	Tm	95		No	
Enfriamiento	40	30 seg	20	No	

Finalizada la reacción de PCR, se analizaron las curvas de Tm obtenidas para confirmar la existencia de un solo producto de amplificación por cada pareja de cebadores utilizada. Del mismo modo, se corrió un gel de agarosa del 2 % para comprobar que el amplificado obtenido en la reacción de PCR era del tamaño esperado.

Los valores de Ct de cada muestra se obtuvieron con el software *LightCycler® 480 Software Release v.1.5.0* (Roche), cuantificándose la variación relativa de la expresión génica mediante el método matemático del  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Este método permite cuantificar cambios relativos en la expresión génica comparando directamente el valor Ct del gen problema con el del gen de referencia en cada muestra ( $\Delta Ct$ ). Posteriormente se comparó el  $\Delta Ct$  de la muestra experimental respecto al de la muestra control sin tratar. Para poder aplicar este método es necesario que la eficiencia de los cebadores problema y referencia, sean similares.

$$\text{Variación en los niveles de expresión} = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ problema} - Ct \text{ control interno}$$

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ situación experimental} - \Delta Ct \text{ situación control}$$

En las muestras obtenidas a partir de las líneas celulares humanas derivadas de HepG2 se utilizó como gen de referencia el RPL13A, el cual codifica a la proteína ribosomal L13A. En el caso de las muestras de hígado de rata se utilizó el gen HRPT, que codifica a la hipoxantina fosforribosiltransferasa. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

### **11.3.2 Diseño de cebadores**

El diseño de los cebadores se realizó mediante la herramienta *online* de acceso libre “Primer-3 v.4.0” (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>), en base a las secuencias existentes en la base de datos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El diseño de los cebadores constituye un punto clave para la cuantificación de los transcritos por qRT-PCR, y se realiza de acuerdo a las siguientes condiciones:

- Contenido de G+C: 40-60%.
- Temperatura de hibridación: 57-65°C.
- Tamaño del cebador: 18-27pb.
- Tamaño del producto: 70-210pb.
- Los cebadores deben tener una  $T_m$  similar, con una diferencia no mayor a los 5°C.
- Los cebadores deben de estar localizados en exones diferentes del ADNc para evitar amplificar ADN genómico.
- Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.

Una vez diseñados, se comprobó que los cebadores eran específicos para el gen problema comparando sus secuencias frente a todo el genoma. Para ello se utilizó el programa libre BLAST del NCBI.

La elección de la concentración de trabajo de los cebadores se realizó en base a la eficiencia de amplificación de los genes en estudio, empleando concentraciones seriadas de ARNm (200, 100, 50, 25,

12.5ng). Para ello, se representaron los valores de Ct frente al logaritmo de las distintas concentraciones de ARNm para cada pareja de cebadores y cada concentración. Es fundamental que la concentración de trabajo seleccionada permita que la pareja de cebadores sea cuantitativa, duplicándose el número de copias de ADN en cada ciclo de amplificación. La curva de eficiencia proporciona esa información, debiéndose obtener para ello una recta de regresión lineal con un valor de próximo a 1, y una pendiente cercana a  $-3,32 \text{ Log}(x)$ , en cuyo caso se asume una eficiencia de reacción del 100%. El cálculo de la eficiencia de amplificación se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = [ 10^{(-1/\text{pendiente})} ] - 1$$

En las siguientes tablas se muestran la pendiente de la ecuación de la recta, la eficiencia, el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y la concentración empleada de las distintas parejas de cebadores humanos (Tabla 10) y de rata (Tabla 11) utilizados.

**Tabla 10. Eficiencia de los cebadores de humano.**

<b>Gen#</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Eficiencia</b>	<b>Correlación</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>NOS-3</b>	-3,345	-1,029	0,99	0,55
<b>GPX4</b>	-3,202	-1,031	0,99	0,6
<b>CAT</b>	-2,831	-1,035	0,99	0,25
<b>SOD1</b>	-3,117	-1,032	0,99	0,6
<b>SOD2</b>	-2,694	-1,037	0,99	0,8
<b>RPL13A</b>	-3,145	-1,031	0,97	0,4

**Tabla 11. Eficiencia de los cebadores de rata.**

<b>Gen#</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Eficiencia</b>	<b>Correlación</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>Nos-3</b>	-3,207	1,031	0,99	0,15
<b>Gpx1</b>	-2,690	1,037	0,99	0,25
<b>Gpx4</b>	-2,978	1,033	0,99	1
<b>Cat</b>	-3,270	1,030	0,99	0,5
<b>Sod1</b>	-3,250	1,030	0,99	0,25
<b>Sod2</b>	-3,027	1,030	0,99	0,25
<b>Hrpt</b>	-3,145	1,031	0,99	0,25

## **12. ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT**

El análisis de la expresión proteica se realizó en los extractos celulares y en los lisados del tejido hepático mediante la técnica de electroforesis y western-blot o inmunoblot. Esta técnica se basa en la separación de las proteínas presentes en la muestra de acuerdo a su peso molecular, su transferencia a una membrana y su detección inmunológica mediante el uso de anticuerpos específicos.

### **12.1 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE**

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida del 10-12% (PAGE, del inglés *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) y en condiciones desnaturalizantes, empleando el sistema Mini-Protean III.

El sistema de electroforesis utilizado fue el discontinuo, incluyendo dos tipos de geles: el gel concentrador y el gel separador. En este sistema, cada uno de los geles se prepara con tampones de diferente pH y fuerza iónica:

- El gel concentrador posee un tamaño de poro no restrictivo, asegurando la migración conjunta de todas las proteínas que se han cargado en el pocillo y concentrándolas en una banda antes de ingresar en el gel separador.
- El gel separador permite la separación de las proteínas de acuerdo a la carga y al peso molecular de las mismas.

Los tampones empleados para la preparación de los geles se detallan a continuación:

- Tampón concentrador 2X: 0,25M Tris-HCl pH 6,8, 7mM SDS y completar con H<sub>2</sub>O destilada.
- Tampón separador 2X: 0,74M Tris-HCl, pH 8,8, 7mM SDS y completar con H<sub>2</sub>O destilada.

El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida utilizado para la elaboración del gel concentrador fue siempre del 4%, variando en el gel

separador en función del peso molecular de la proteína a detectar. En la Tabla 12 se indica la composición del gel separador al 10% y 12%, y del gel concentrador al 4%. El persulfato amónico (APS) suministra a la reacción radicales libres que son estabilizados por el N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED), generándose una reacción en cadena iniciada en los monómeros de acrilamida que les permite polimerizarse en largas cadenas, siendo posteriormente entrecruzados con la bisacrilamida, formándose así la matriz del gel.

**Tabla 12. Composición de los geles utilizados en SDS-PAGE.** En las distintas columnas se indica el volumen de cada compuesto para la elaboración de un gel separador al 10%, un gel separador al 12% y un gel concentrador al 4%.

<b>Composición#</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>Concentrador</b>
<b>Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1)</b>	2,5ml	3ml	300µl
<b>Tampón 2X</b>	5ml	5ml	1,5ml
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	2,5ml	2ml	1,2ml
<b>APS 10%</b>	100µl	100µl	30µl
<b>TEMED</b>	5µl	5µl	1,5µl

## 12.2 Elaboración de los geles

Una vez mezclados todos los componentes del gel separador, se depositó cuidadosamente entre el espacio formado por los dos cristales que constituyen el soporte del sistema de electroforesis, dejando por encima unos 2cm libres para, posteriormente, poder incorporar el gel concentrador. Rápidamente, se añadió cuidadosamente sobre el gel separador un volumen suficiente de isopropanol para evitar la entrada de oxígeno y favorecer la polimerización recta del gel. Tras 25min aproximadamente a TA, cuando ya hubo polimerizado el gel, se retiró el isopropanol y se lavó con suficiente agua destilada para eliminar los restos del alcohol. El exceso de agua se retiró con ayuda de un papel

secante, incorporándose seguidamente el gel concentrador hasta el borde superior de los cristales, e insertándose el peine que daba forma a los pocillos donde posteriormente se cargarían las muestras y el marcador de peso molecular. Una vez polimerizado el gel concentrador, se retiró el peine y se lavaron los pocillos con tampón de electroforesis (25mM Tris-base, 3,5mM SDS, 192mM glicina), con ayuda de una pipeta, para retirar los restos de acrilamida no polimerizada que pudieran quedar adheridos a la pared de los pocillos. Finalmente, la cubeta de electroforesis se rellenó con tampón de electroforesis hasta el borde superior de los cristales.

### **12.3 Preparación de las muestras. Electroforesis**

Para la preparación de las muestras, se mezclaron entre 20-100 $\mu$ g de proteínas con tampón de carga 4X, conteniendo Tris HCl pH 6,8 (160mM), EDTA (20mM), glicerol (20%), dodecilsulfato sódico (SDS, 8%), 2-mercaptoetanol (4%) y azul de bromofenol (0,4%). Las condiciones desnaturizantes se consiguieron mediante el detergente aniónico SDS, el cual, además de romper los enlaces no covalentes de las proteínas haciendo que estas pierdan su conformación nativa y se desnaturalicen, proporciona a las proteínas una carga negativa extra, proporcional a su masa molecular. De este modo, el SDS consigue eliminar las diferencias en conformación de las distintas proteínas que han de separarse en el gel, las cuales pueden separarse ahora de acuerdo a su masa molecular. Por otro lado, el empleo de  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor rompe los enlaces disulfuro de las proteínas, contribuyendo a su desnaturalización. El proceso de desnaturalización finalizó tras hervir las muestras (mezcladas con el tampón de carga) durante 5min a 95°C. A partir de este momento, las muestras se conservaron en el hielo hasta el momento de cargarse en el gel, evitando así la renaturalización de las proteínas.

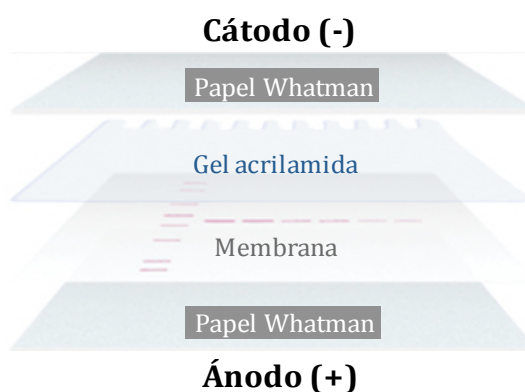
Las muestras (40  $\mu$ l) se cargaron en los pocillos del gel acorde con el diseño del estudio junto con un patrón de peso molecular (10  $\mu$ l). El

marcador contenía un total de 10 proteínas recombinantes purificadas, con una masa molecular de entre 10-250 kD. Finalizado el proceso de carga, se cerró el sistema y se inició el proceso de electroforesis mediante la aplicación de una corriente eléctrica de 15 miliamperios (mA)/gel hasta que las muestras alcanzaron el gel separador. A partir de ese momento, la intensidad se incrementó a 30mA/gel hasta que el frente de avance alcanzó la parte inferior del gel.

## 12.4 Transferencia de las proteínas

El proceso de transferencia en la técnica de Western blot consiste en el paso e inmovilización de las proteínas, presentes en el gel de bisacrilamida a una membrana sintética para, posteriormente, ser detectadas con el empleo de anticuerpos. En este caso, siempre se utilizó un sistema de transferencia semi-húmedo. Previamente, fue necesario equilibrar el gel, la membrana de nitrocelulosa y el papel absorbente Whatman en tampón de transferencia (48mM Tris base, 39mM glicina, y 20% metanol), durante 20min a TA. A continuación, se montó un sándwich húmedo (Fig.44), orientado desde el cátodo hasta el ánodo en el orden: papel Whatman - gel - membrana de nitrocelulosa - papel Whatman.

**Fig.44. Transferencia de proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa.** Imagen representativa de la orientación.

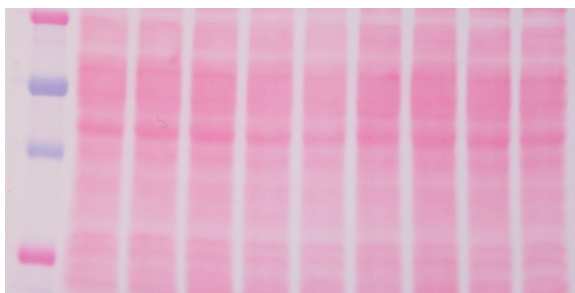


Una vez montado el sándwich sobre el sistema de transferencia *Trans-Blot® Semi-dry Transfer Cell*, se aplicó un campo eléctrico de 20V durante 1h. De esta forma, las proteínas del gel, cargadas negativamente, se desplazaron hacia el polo positivo, quedando atrapadas en la membrana de nitrocelulosa.



Para confirmar la equivalencia de carga de proteína entre las distintas calles y la integridad de las muestras, la membrana se tiñó inmediatamente después de la transferencia con rojo Ponceau al 0,1% disuelto en H<sub>2</sub>O destilada y un 5% de ácido acético, durante 15min, en agitación a TA. Al finalizar, la membrana se lavó con agua destilada para eliminar el exceso del colorante, hasta que únicamente quedaron teñidas las proteínas transferidas a la membrana (Fig.45). Tras capturar una imagen de la membrana con ayuda del sistema de análisis de imagen LASS-3000 y el software *L. Process v.2.2* (Fujifilm), y comprobar que la carga, integridad proteica y la transferencia eran correctas, la membrana se lavó y se mantuvo en tampón TTBS (1M Tris HCl pH 7,6, 5M NaCl, 0,05% Tween-20) hasta su bloqueo.

**Fig.45.**  
**Membrana de**  
**nitrocelulosa**  
**teñida con rojo**  
**Ponceau.**  
Imagen  
representativa.



## 12.5 Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa

Puesto que la membrana de nitrocelulosa tiene la capacidad de unirse a proteínas de forma inespecífica, es necesario bloquear los lugares de unión que han quedado libre tras la transferencia para minimizar la unión inespecífica de los anticuerpos durante el proceso de western-blot, y, por tanto, el ruido de fondo. Previamente, se realizaron tres lavados con TTBS, de 5min cada uno, en agitación a TA. De esta forma, retiramos los restos de rojo Ponceau. Para el bloqueo, se preparó una solución rica en proteínas, conteniendo leche desnatada en polvo al 5% en TTBS, donde se incubó la membrana durante 2h a TA o durante toda la noche a 4°C, siempre con agitación suave (50rpm).

## 12.6 Inmunodetección y revelado

Finalizado el bloqueo, se realizaron tres lavados de 5min con TTBS, a TA y con agitación para retirar los restos de la solución de bloqueo. A continuación, la membrana se incubó con el correspondiente anticuerpo primario (monoclonal o policlonal) diluido en una solución conteniendo leche desnatada en polvo al 1% en TTBS, durante toda la noche a 4°C ó durante 1h a TA, con agitación suave. A partir de este momento, todos los lavados e incubaciones de la membrana se hicieron a TA y con agitación suave.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó 5 veces con TTBS y se incubó durante 1h con el correspondiente anticuerpo secundario (anti-cabra, anti-conejo ó anti-ratón) diluido 1/20.000 en la misma solución anterior utilizada para el anticuerpo primario.

Los anticuerpos primarios empleados, así como la región de la proteína que reconocen, la dilución de trabajo, su reactividad y peso molecular se indican en la Tabla 13.

**Tabla 13. Lista de anticuerpos primarios utilizados para western-blot.**

<b>Anticuerpo#</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Dilución</b>	<b>Reactividad</b>	<b>P.M</b>
<b>NOS-3</b>	NOS-3 (C-terminal)	1: 200	Humano	140
<b>cJun</b>	cJun(1-79)	1: 2.000	Humano, rata	39
<b>p-cJun</b>	Ser63 fosfo-cJun	1: 300	Humano, rata	39
<b>cFos</b>	cFos(N-terminal)	1: 200	Humano, rata	62
<b>p-cFos</b>	Ser374 fosfo cFos	1: 100	Humano, rata	62
<b>SP1</b>	SP1 (609—627)	1: 2.000	Humano, rata	106
<b>p-SP1</b>	Thr453 fosfo SP1	1: 1.000	Humano, rata	120
<b>p-JNK</b>	Thr183/Tyr185 fosfo JNK	1: 300	Humano	54
<b>p-ERK1/2</b>	Thr202/Tyr204 fosfo ERK1/2	1: 2.000	Humano	44/42
<b>Ciclina D1</b>	Ciclina D1 (C-terminal)	1: 2.000	Humano	36
<b>β-Actina</b>	β-Actina	1: 10.000	Humano, rata	43

Transcurrida la incubación con el anticuerpo secundario la membrana se lavó 5 veces con TTBS y, tras escurrir el exceso de tampón, se incubó con el reactivo de detección ECL Advance, durante 5min, a TA y en oscuridad. Todos los anticuerpos secundarios utilizados eran anti-IgG y estaban conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP). Durante el revelado, la HRP cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produciendo una reacción quimioluminiscente que desprende energía en forma de luz. Esta luminiscencia fue detectada en una imagen por el sistema de análisis LASS 3000. De esta forma, las proteínas inmunodetectadas con el anticuerpo primario correspondiente y posteriormente marcadas con el anticuerpo secundario conjugado con la HRP, se hacen visibles. Se realizaron varias exposiciones de la membrana, a distintos tiempos, hasta obtener una imagen clara, nunca saturada, que pudiera ser correctamente densitometrada con posterioridad. Tras el revelado, se realizaron 4 lavados de la membrana en TTBS o bien se conservó a -20°C protegida con film transparente, o bien se sometió a un proceso de *stripping* para volver a incubar con un nuevo anticuerpo primario.

Para normalizar los valores de expresión de proteínas mediante western-blot, estos se refirieron al valor de expresión de una proteína constitutiva. En el caso de los extractos celulares de HepG2, se utilizó la proteína de citoesqueleto  $\beta$ -actina. Debido a que la ligadura del conducto biliar induce la expresión de proteínas comúnmente utilizadas como control de carga, como la propia  $\beta$ -actina o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el análisis de expresión de los FTs en los lisados de tejido hepático del estudio *in vivo* fueron evaluados comparando el cociente entre el valor de proteína fosforilada/no fosforilada, empleando la tinción rojo Ponceau como control de carga. Del mismo modo, el análisis de expresión de NOS-3 en este mismo estudio *in vivo* se refirió a la cantidad de proteína transferida a la membrana (tinción rojo Ponceau). En este caso, para evitar errores en la cuantificación de NOS-3 debido al uso de diferentes geles para el

análisis de numerosas muestras, se empleó una misma muestra control como control interno para cada uno de los geles (membranas) analizados.

### **12.7 Cuantificación de las bandas de proteínas**

Durante el revelado, la banda correspondiente a la proteína de interés fue localizada en la membrana de acuerdo a su peso molecular teórico, empleando como referencia el marcador de peso molecular. Teniendo en cuenta que la señal obtenida tras revelar resulta proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana, a continuación, se procedió a cuantificar la banda de interés mediante el software de análisis de imágenes *Quantity One v.4.4.0* (BioRad). Los resultados se representaron como U.A.

### **12.8 Reutilización de las membranas**

Con el fin de poder detectar una nueva proteína en una membrana ya utilizada previamente para el mismo propósito, dicha membrana fue sometida a un proceso de *stripping* para eliminar los anticuerpos unidos con anterioridad. El proceso consistió en sumergir la membrana en una solución conteniendo 1M Tris-HCl pH 6,7, 2-mercaptoetanol al 0,72%, y 10% SDS, incubándose a 58°C durante 30min en agitación. Transcurrido este tiempo se realizaron cuatro lavados en TTBS, de 5min cada uno, a TA y con agitación suave. A partir de este momento, la membrana pudo ser de nuevo bloqueada y sometida a inmunodetección con el anticuerpo de interés.

## **13. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO**

La producción de ON en las células HepG2 se evaluó indirectamente en el medio de cultivo mediante la cuantificación de los productos finales relacionados con el metabolismo del ON: nitratos y nitritos. Los nitratos y nitritos son productos estables procedentes de la degradación del ON, formados en cantidades equimoleculares a la L-

citrulina. El medio de cultivo se recogió tras 24h de la administración de los tratamientos, favoreciéndose así la acumulación de nitratos y nitritos en el medio extracelular. Esto aseguró la sensibilidad y la reproducibilidad de la reacción. El ensayo consistió en la reducción del nitrato presente en la muestra hasta nitrito, con la participación de la nitrato reductasa. A continuación, se determinó la concentración total de nitrito mediante la reacción de diazotación descrita por Griess.

Brevemente, un volumen de 400 $\mu$ l de muestra se incubó con 0,2mU/ $\mu$ l de nitrato reductasa en presencia de 48 $\mu$ M NADPH y 48mM flavín adenina dinucleótido (FAD), durante 20min a 37°C. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo mediante la adición de 10mM piruvato sódico y 0,025 $\mu$ g/ $\mu$ l de LDH, consumiéndose así el exceso de poder reductor. Tras 5min a 37°C y en oscuridad, las proteínas de la muestra fueron precipitadas en presencia de 52mM ZnSO<sub>4</sub>, mediante centrifugación a 18.000g durante 5min y 4°C. Finalmente, el nitrito presente en el sobrenadante se detectó al incubar un volumen (100 $\mu$ l) del mismo con otro volumen igual de reactivo de Griess (58mM sulfanilamida, 2,5% PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> y 3,58mM n-naptil-etilen-diamina diclorhidrato), durante 10min a 37°C y en oscuridad. Como resultado, se desarrolló un colorante azoico de gran intensidad, que se midió espectrofotométricamente a una DO<sub>540nm</sub>. Para la cuantificación de los niveles de nitrito+nitrato se elaboró una recta patrón a partir de una solución de NO<sub>3</sub>Na 100mM, sometida al mismo procedimiento descrito anteriormente, exceptuando la precipitación proteica con ZnSO<sub>4</sub>. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Los resultados se presentaron como  $\mu$ M ON x mg<sup>-1</sup> proteína x ml<sup>-1</sup> medio de cultivo.

## 14. IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES SITIOS DE UNIÓN PARA FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN EL PROMOTOR DE NOS-3

La identificación de posibles sitios de unión para factores de transcripción (TFBS, del inglés *Transcription Factor Binding Sites*) en la secuencia de 1.601pb del pNOS-3 se realizó mediante análisis computacional, empleando las siguientes herramientas *on line* de acceso libre:

- **Transcription Factor Search (TFsearch) v.1.3**  
(<http://www.cbrc.jp.reserach/db/TFSEARCH.html>).
- **Transcription Element Search System (TESS)**  
(<http://www.cbil.upenn.edu/tess>).
- **Transcription Factor Site Scan (TF Site Scan)**  
(<http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl>).

Tras el análisis, fueron seleccionados para posteriores análisis aquellos sitios de unión comunes a los tres programas de predicción.

## 15. ENSAYO DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

El ensayo de movilidad electroforética o EMSA es una técnica utilizada para estudiar la interacción entre proteínas y fragmentos de ADN. Para ello, la fracción nuclear se incubaba con una secuencia de ADN complementaria al sitio de reconocimiento del FT objeto de estudio, y marcada radiactivamente (sonda de ADN). Cuando el FT correspondiente se encuentra en la fracción nuclear purificada, se produce su unión a la sonda y, al comparar su avance electroforético en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas, se observa un evidente retardo del complejo ADN-proteína respecto a la sonda de ADN libre.

## 15.1 Obtención de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos correspondientes a los sitios de unión de MAZ y de GATA-1 localizados en las posiciones -46 y -235 respectivamente, del pNOS-3, fueron sintetizados por Sigma Aldrich como oligonucleótidos de cadena simple, con extremo 5'OH romo para favorecer la incorporación del grupo  $\gamma$ -fosfato. La hibridación de los oligonucleótidos se realizó mezclando una misma cantidad (17,5  $\mu$ M) del oligonucleótido sentido (F) y del antisentido (R), en tampón TE (10mM Tris-HCl y 1mM EDTA pH 8), incubándose posteriormente en el termociclador Gene Amp PCR System 2400. El protocolo de anillamiento consistió en un calentamiento de 2min a 95°C seguidos de 45min a 25°C y toda la noche a 4°C. Tras la hibridación, los oligonucleótidos fueron conservados a -20°C hasta el momento de su uso. Para la detección de los FTs AP-1 y SP1, se utilizaron oligonucleótidos de ADN de doble cadena comerciales, contiendo el sitio de unión consenso para el FT correspondiente, y con extremo 5'OH romo. Las secuencias de los oligonucleótidos se indican en la tabla;

**Tabla 14. Oligonucleótidos empleados para el ensayo EMSA.**

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Región
<b>MAZ_F</b>	CTCGGTCC <b>CCCTCCCTC</b> TTCCTAAG	-53/-30
<b>MAZ_R</b>	CTTAGGAA <b>GAGGGAGGG</b> GACCGAG	
<b>GATA-1_F</b>	GCTCC <b>CACTTATCAGCCT</b> CAGTC	-239/-217
<b>GATA-1_R</b>	GACTG <b>AGGCTGATAAGTGG</b> GAGC	
<b>AP-1_F</b>	CGCTTGAT <b>TGAGTCA</b> GCCGGAA	Sec. consenso
<b>AP-1_R</b>	TTCCGG <b>CTGACTCA</b> TCAAGCG	
<b>SP1_F</b>	ATTCGAT <b>TCGGGGCGGGGC</b> GAGC	Sec. consenso
<b>SP1_R</b>	GCTC <b>GCCCCGCCCC</b> GATCGAAT	

## **15.2 Marcaje y purificación de los oligonucleótidos**

La reacción del marcaje radioactivo de la sonda de ADN se realizó incubando 35pmol del oligonucleótido con 87,5µCi del radioisótopo <sup>32</sup>P-γ-ATP (EasyTides® Adenosine 5'-triphosphate), en presencia de 10U de la polinucleótido quinasa del fago T4 (T4PNK), para catalizar la transferencia del grupo γ-fosfato desde el ATP al extremo 5'-OH del oligonucleótido. Dicha reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30min, en un volumen final de 87,5µl de tampón de fosforilación (50mM imidazol-HCl pH 6,6, 10mM Mg<sub>2</sub>Cl, 5mM DTT, 0,1mM espermina, 0,1mM EDTA). Tras la incubación, la reacción se detuvo con 0,4M EDTA y el exceso de <sup>32</sup>P-γ-ATP no incorporado fue eliminado mediante columnas de Sephadex G25 (MicroSpin™ G-25). Finalmente, el oligonucleótido marcado se resuspendió en 250µl de tampón TE, se alicuotó y fue conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

## **15.3 Incubación del extracto nuclear con el oligonucleótido marcado**

La unión del FT a la sonda de ADN se realizó incubando 15µg de proteína, procedente del extracto nuclear, con 10fmol de sonda marcada, durante 15min a temperatura ambiente. Previamente, la mezcla de proteínas se incubó en hielo durante 15min, en un volumen final de 23µl, conteniendo 5µl de tampón de unión (10mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 5% glicerol) y 0,04µg de sal sódica del ácido poli deoxinosínico-deoxicitidílico [poly(dI-dC)- poly(dI-dC)] disuelta en tampón TE. El poly(dI-dC)- poly(dI-dC) es un polinucleótido de doble cadena que actúa como un competidor no específico, minimizando las interacciones inespecíficas con la sonda de ADN. Una vez transcurrida la incubación del extracto nuclear con el oligonucleótido marcado, se añadieron 2µl de azul de bromofenol al 0,1% para indicar la migración de la muestra en el gel.



El ensayo de competición específica se realizó mediante la incubación de la muestra con un exceso de sonda fría, sin marcar. Brevemente, tras la incubación del extracto nuclear en hielo, se incorporó a la mezcla 1pmol de sonda fría, manteniéndose en hielo durante 1 hora adicional. Posteriormente, se continuó el protocolo descrito con anterioridad, al añadir a la mezcla de reacción 10fmol de sonda marcada. De esta manera, se estableció la competencia entre la sonda fría y la sonda caliente (marcada).

La especificidad de la reacción se valoró mediante el ensayo de *supershift*, incubando la muestra en presencia de 1µg del anticuerpo anti-cJun y anti-cFos, durante 1 hora en hielo, previa administración de la sonda radioactiva, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Todas las muestras se reservaron a temperatura ambiente hasta el momento de ser cargadas en el gel de poliacrilamida.

#### **15.4 Electroforesis, fijación y secado del gel**

El complejo ADN-proteína se separó en un gel del 6% de poliacrilamida no desnaturizante (Tabla 15), en tampón TBE (50mM Tris-HCl pH 8, 50mM ácido bórico, 1mM EDTA-N<sub>2</sub>), fijándose las condiciones de la electroforesis a 150V (voltaje constante) y 70mA, durante 3 h y a temperatura ambiente. La electroforesis se realizó en el sistema vertical *Protein II xi*.

**Tabla 15. Composición del gel de poliacrilamida al 6% empleado para el ensayo de EMSA radiactivo.**

Composición	Gel 6%
<b>Acrilamida/Bis 29:1</b>	15ml
<b>TBE 5X</b>	20ml
<b>H2O destilada</b>	65ml
<b>APS 10% (p/v)</b>	1ml
<b>Temed 0,05%</b>	50µl

Finalizada la electroforesis, el gel se fijó sumergiéndolo en una solución del 30% de metanol y 10% de ácido acético glacial, durante 15min a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel se desecó sobre papel de filtro tipo Whatman con ayuda de una bomba de vacío conectada a un secador de geles, durante 2 h a 90°C.

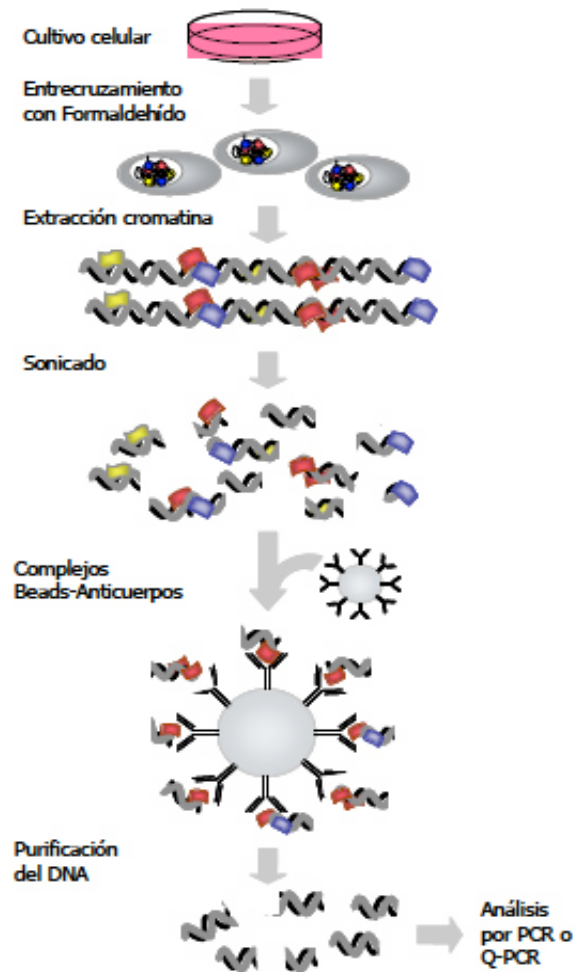
### **15.5 Revelado y cuantificación de las bandas**

Tras su secado, el gel se expuso a una película fotográfica o autorradiografía, empleando un casete que contiene una pantalla de intensificación de la señal. La exposición se realizó a -80°C durante toda la noche, o el tiempo necesario hasta desarrollarse una señal cuantificable. Así pues, se realizaron tantas exposiciones como fueron necesarias. Finalmente, la autorradiografía se reveló con una solución de revelado fotográfico y otra de fijación, se escaneó con ayuda del sistema GS-800 Calibrated densitometer y se cuantificó mediante análisis densitométrico con el software *Quantity One v.4.4.0*. Los resultados se presentaron en U.A.

## **16. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA**

La técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se basa en la identificación de los FTs que se encuentran unidos a la cromatina *in vivo*, inmunoprecipitándolos para posteriormente amplificar la secuencia de ADN asociada al FT en estudio. Así pues, esta técnica se divide en diferentes pasos o apartados que se resumen en la Figura 46 y que incluyen: el entrecruzamiento de la cromatina, su extracción, sonificado e inmunoprecipitación de los FTs y, por último, el análisis del ADN mediante qRT-PCR.

**Fig.46. Esquema representativo de un experimento de ChIP.** Las células en cultivo se fijan con formaldehído al 1%, se extrae y sónica la cromatina y, a continuación, se somete a inmunoprecipitación con los anticuerpos de interés. Finalmente, el ADN se purifica y se analiza por qRT-PCR.



## 16.1 Entrecruzamiento de la cromatina y aislamiento de los núcleos

Para cada ensayo y cada tratamiento ensayado, se crecieron entre 8-10 placas de 100mm de diámetro, a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup>. A las 72h de la puesta en cultivo, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS. El entrecruzamiento de la cromatina se llevó a cabo incubando las células con formaldehído al 1% diluido en PBS, durante 30min, en agitación y a TA, favoreciéndose la fijación de las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN. Este proceso se detuvo mediante la adición de 0,125mM glicina, durante 5min, en agitación y a TA. A continuación, las células se recogieron con ayuda de un rascador, transfiriéndolas a un tubo y centrifugándolas a

1.500g durante 2min a 4°C. A partir de este momento, todos los pasos se realizaron en hielo. El sedimento celular se lavó dos veces con 10ml de PBS y se centrifugó a 1.500g durante 2min. Tras el segundo lavado, el precipitado de células se resuspendió en 1,3ml de PBS y se centrifugó a 18.000g durante 1min. Para la rotura celular, el pellet se resuspendió en 2ml de tampón de extracción constituido por 10mM HEPES, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton-X-100, 0,1% desoxicolato de sodio, 0,2mM PMSF y 1 comprimido/10ml de inhibidores de proteasas, y se transfirió a un homogeneizador de teflón-vidrio, sometiéndolo a rotura mecánica en frío a 600rpm, mediante 4 ciclos de 10min/ciclo. Con objeto de favorecer al máximo la rotura celular, las células se sometieron a un movimiento de rotación vertical durante 1h en frío. A continuación, las células se centrifugaron a 400g durante 1min, y se resuspendieron de nuevo en 2ml de tampón de extracción. En este momento, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se mezcló con un mismo volumen de la solución de azul tripán para comprobar en el microscopio si los núcleos se habían extraído correctamente. Una vez verificado, los núcleos fueron alicuotados y congelados a -80°C hasta su uso. En caso contrario, la suspensión celular volvió a homogeneizarse hasta conseguir la ruptura celular.

## **16.2 Sonicación de la cromatina**

Como paso previo a la inmunoprecipitación, fue necesario sonicar la cromatina hasta obtener fragmentos con una longitud comprendida entre las 150-500pb para que, posteriormente, el proceso de inmunoprecipitación fuese más eficiente. La sonicación consiste en la aplicación de ultrasonidos a una muestra, con la finalidad de agitar las partículas que contiene hasta fragmentarlas. El método de sonicación debe conservar la integridad del ADN y/o de los complejos biológicos, incluyendo la cromatina, la unión proteína-proteína y los complejos de proteína-ADN.

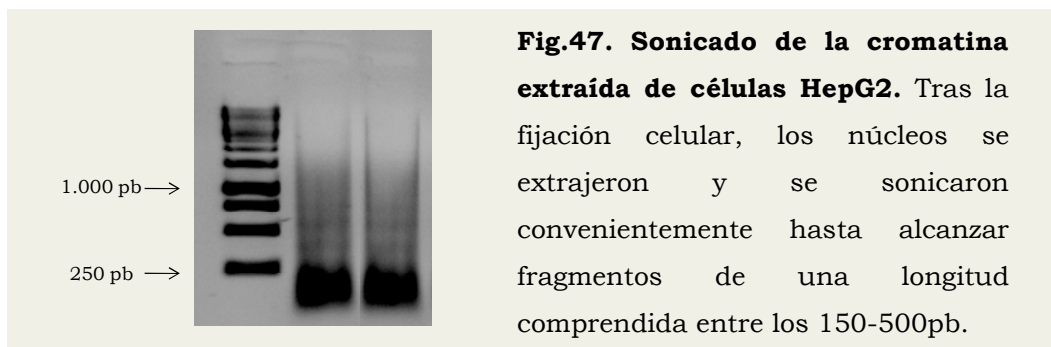
El sonicador empleado fue el Bioruptor™ UCD-200, el cual genera ondas de sonicación que emanan de un elemento de ultrasonido ubicado por debajo de un baño de agua, dentro del cual se sitúan los tubos que contienen las muestras. De esta forma, se utiliza la energía de los ultrasonidos para generar un estrés mecánico dirigido a lisar los núcleos previamente aislados y a fragmentar la cromatina. Durante el proceso de sonicación se utilizó un volumen máximo de 300µl por tubo, aplicando pulsos de 1min con descansos de 20s entre un pulso y el siguiente, durante aproximadamente 2h. Además, las muestras se mantuvieron en continua rotación horizontal, asegurándose una óptima distribución de la energía que permitiera una sonicación eficiente.

### **16.3 Comprobación de la sonicación**

Tras la sonicación, fue necesario comprobar si los fragmentos de cromatina obtenidos presentaban una longitud adecuada. Para ello, la muestra se centrifugó a 18.000g durante 15min a 4°C, tomándose una alícuota de 100µl que fue sometida a reversión de la fijación o del entrecruzamiento con 5M NaCl durante 3h a 65°C. Posteriormente, la alícuota se incubó 1h con 1µl ARNasa (10µg/ml) a 37°C, y se purificó el ADN con el *QIAquick® PCR purification kit*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 5 volúmenes de tampón PB con un volumen de muestra, favoreciéndose la unión posterior del ADN a una membrana de sílice por el elevado contenido en sales que contiene el tampón. Cuando la mezcla adquirió un color naranja o violeta, se añadieron 10µl de 3M acetato sódico hasta alcanzar una tonalidad amarilla (pH≤7,5) logrando así el pH óptimo de adsorción del ADN a la membrana. A continuación, la muestra se transfirió a una columna de purificación conteniendo la membrana de sílice, acoplada a un tubo de recolección de 2ml, y se centrifugó a 18.000rpm durante 1min. La columna se lavó con 750µl de tampón PE para eliminar las impurezas presentes en la muestra, y se centrifugó de nuevo. Finalmente, el ADN fue eluído tras añadir sobre el centro de la

membrana 50µl de tampón EB (10mM Tris-HCl pH 8,5) y centrifugado. El volumen de elución resultante fue alicuotado y conservado a -20°C hasta su uso.

Para la comprobación del tamaño de los fragmentos, una alicuota de 20µl de esta muestra representativa purificada, se mezcló con 5µl de tampón de carga LB y se cargó en un gel de agarosa al 1% con 0,5µg/ml de bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se empleó el *Gene Ruler 1Kb DNA ladder 0,1µg/µl*, compuesto por 14 fragmentos de ADN purificados por cromatografía (Fig.47). La electroforesis se realizó a 100V constantes durante 30min, visualizándose el tamaño de los fragmentos con el sistema LASS 3000.



#### 16.4 Bloqueo de . | " 0120 .3 y preclarificado de cromatina

La inmunoprecipitación de los FTs se llevó a cabo con el empleo de bolas magnéticas o *dynabeads*<sup>®</sup> de 2,8µm, que llevan unidas en la superficie, de forma covalente, proteína G recombinante. Previamente, fue necesario someter las muestras a un proceso de preclarificado en presencia de las *dynabeads*, con el objetivo de retirar posibles impurezas presentes en la muestra y evitar futuras uniones inespecíficas del anticuerpo. Para ello, con ayuda de un rack magnético, se retiró el PBS donde las *dynabeads* se encontraban resuspendidas y, a continuación, se bloquearon en un mismo volumen de tampón CLB4 (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 0,1% azida, 100µg/ml BSA y 10% λADN más ARNt *S. cerevisiae*). A continuación, y tras cuantificar el ADN

de la muestra en el espectrofotómetro, cada fracción de cromatina se pre-clarificó en presencia de 20µl de *dynabeads* previamente bloqueadas, aplicando una rotación continua durante 1h a 4°C.

## 16.5 Inmunoprecipitación de la cromatina

Una misma cantidad de cromatina pre-clarificada (2,5µg) se incubó con 4µg de anticuerpo, mediante rotación continua durante toda la noche y a 4°C. Como fracción “*Input*” se tomó una alícuota de cromatina sin inmunoprecipitar (1,25 µg); como control positivo y negativo (o no reactivo) del ensayo se utilizó el anticuerpo de la ARN polimerasa II y el anticuerpo de la IgG de conejo, respectivamente. Los anticuerpos empleados para la inmunoprecipitación de la cromatina se indican en la tabla 16.

El protocolo de inmunoprecipitación se inició incubando la muestra con 40µl de *dynabeads* bloqueadas, en continua en agitación y a TA. Transcurridas 2h, las *dynabeads* fueron magnetizadas al fondo del tubo con ayuda del rack magnético, se retiró el sobrenadante y la muestra se lavó con el uso de 3 tampones consecutivos. La composición de los tampones se indica a continuación:

- **Tampón TSE-150;** 20mM Tris HCl pH 8, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Triton-X-100.
- **Tampón TSE-500;** 20mM Tris HCl pH 8, 500mM NaCl, 2mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Triton-X-100.
- **Tampón LiCl;** 10mM Tris HCl pH 8, 0,25M LiCl, 1mM EDTA, 1% desoxicolato de sodio, 1% NP-40.

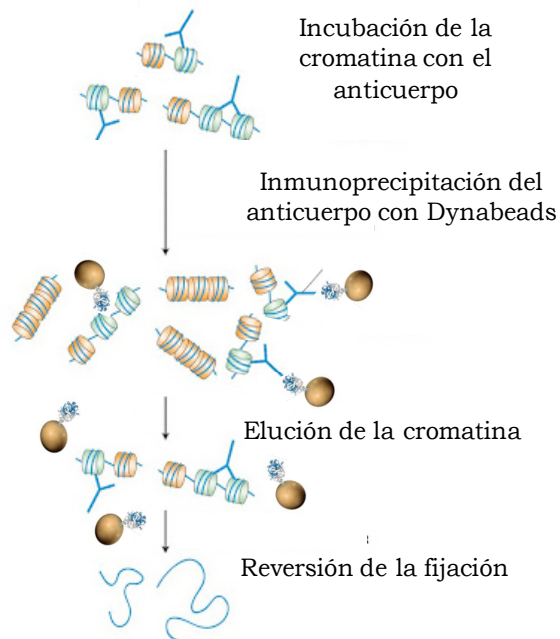
**Tabla 16. Lista de anticuerpos utilizados en los ensayo de ChIP.**

<b>Anticuerpos<sup>#</sup></b>	<b>Especificidad</b>	<b>Vol. [4µg]<sup>†</sup></b>
<b>cJun (H-79) X</b>	cJun (N-terminal)	2µl
<b>cFos (4)-G</b>	cFos (N-terminal)	20µl
<b>SP1 (1C6) X</b>	SP1 (609-627)	2µl
<b>MAZ (H-50) X</b>	MAZ (381-430)	2µl
<b>GATA-1 (H-200) X</b>	GATA-1 (1-200)	2µl
<b>GATA-4 (C-20) X</b>	GATA-4 (C-terminal)	2µl
<b>Pol II (N-20)</b>	RNA polimerasa II (N-terminal)	20µl
<b>Normal rabbit IgG</b>	No conjugada. IgG purificada por afinidad	10µl

Tras el proceso de lavado, la cromatina inmunoprecipitada fue eluída en 100µl de una solución compuesta por 0,1M NaHCO<sub>3</sub> y 1% SDS, durante 30min a 65°C. Posteriormente, se sometió a reversión del entrecruzamiento, incubándola durante 3h a 65°C en presencia de 5M NaCl. A partir de este punto, la fracción *Input* se incluyó nuevamente en el protocolo y se trató como una muestra más. Por último, las muestras se trataron con 1µl de ARNasa (10µg/ml) durante 1h a 37°C y las proteínas se eliminaron con 1µl de proteinasa K (14-22mg/ml), durante 12h a 65°C (Fig.48).



**Fig.48. Esquema representativo del protocolo de inmunoprecipitación.**



## 16.6 Análisis del ChIP mediante qRT-PCR absoluta

Tras purificar el ADN genómico siguiendo el protocolo descrito en la sección 16.3, la cantidad de ADN presente en los inmunoprecipitados y en la fracción *Input* se analizó mediante RT-qPCR absoluta.

La cuantificación absoluta de un transcrito por qRT-PCT se basa en la señal de fluorescencia obtenida durante el proceso de amplificación, empleando una recta de calibrado o recta patrón compuesta por estándares de concentraciones conocidas. El número de moléculas de los transcritos cuantificados se calcula extrapolando los valores de Ct obtenidos para cada muestra, en la recta patrón. La reacción de RT-qPCR absoluta se realizó con la sonda SYBR Green, en un volumen final de 10 $\mu$ l. Para ello, 4,5 $\mu$ l de muestra fueron mezclados con 5 $\mu$ l del *SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit* y la pareja de cebadores correspondiente.

El diseño de los cebadores se realizó mediante el programa *Primer-3 v.4.0*, a partir de las secuencias diana para la unión de los

distintos FTs, localizadas en la secuencia de 1.601pb del pNOS-3. Como norma, dicha secuencia diana debía encontrarse comprendida dentro del amplificado de PCR o muy próximo a él. Por otro lado, las parejas de cebadores para la amplificación del ADNc de los genes de NOS-3 y GAPDH se diseñaron de acuerdo a las secuencias existentes en la base de datos GenBank del NCBI (Tabla 17). La cuantificación absoluta de los transcritos se realizó a partir de una curva de calibración para cada pareja de cebadores, utilizando diluciones seriadas 1/10 de la muestra *Input*, partiendo de 10<sup>4</sup> moléculas, hasta la dilución 1/10.000, que se consideró 1 molécula. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado en un termociclador *LightCycler 480*. Las condiciones utilizadas para el protocolo de amplificación se indican en la tabla 18.

**Tabla 17. Lista de cebadores humanos utilizados en los ensayos de ChIP.** La posición para la unión de los factores de transcripción y los cebadores, hacen referencia a la región del promotor de NOS-3.

Cebadores	Posición	TFBS	FT	Secuencia (5' - 3')
<b>pNOS3-AP1-F</b>	-682/-632	-666	AP-1	CTTTTGTGTCCTCCACTTGAG
<b>pNOS3-AP1-R</b>				CAATTCCTGGAACCCCCAC
<b>pNOS3-SP1-1F</b>	-1471/-1419	-1386	SP1	CTGTTGTCTCCTCCAGCATGGT
<b>pNOS3-SP1-1R</b>				GGATCCAGCCCCTACTTTTCAG
<b>pNOS3-SP1-2F</b>	-679/-629	-632	SP1	TTGTGTCCCCCACTTGAGTCA
<b>pNOS3-SP1-2R</b>				CCCCAATTCCTGGAACCC
<b>pNOS3-SP1-3F</b>	-168/-99	-104	SP1	GCGTGGAGCTGAGGCTTTA
<b>pNOS3-SP1-3R</b>				CGCCCCATCCATACACA
<b>pNOS3-GATA-1F</b>	-260/-209	-235	GATA-1/-4	AGGGCTCTGCTGGACACCT
<b>pNOS3-GATA-1R</b>				GCTGTGAGGACTGAGGCTGAT
<b>pNOS3-MAZ-F</b>	-46/+19	-73	MAZ	CCCTCCCTCTCCTAAGGAAAA
<b>pNOS3-MAZ-R</b>				ACTGTGCGTCCACTCTGCTG
<b>CDS_NOS3-F</b>	677-697 Exón 4 NM_000603.4	-	-	CCGGGACTTCATCAACCAGTA
<b>CDS_NOS3-R</b>	Exón 4/Intrón 4-5	-	-	TCCGGGAAGCTGTCACCTC
<b>CDS_GAPDH-F</b>	155-174 Exón 2 NM_002046.4	-	-	AGCCACATCGCTCAGACACC
<b>CDS_GAPDH-R</b>	Exón2/Intrón 2-3	-	-	ACCCGTTGACTCCGACCTT

Los fragmentos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 2% con 0,5µg/ml de bromuro de etidio. El análisis de los resultados se realizó mediante el *LightCycler® 480 Software Release v.1.5.0*. Los resultados se expresaron en % respecto al *Input*, considerando el valor del *Input* el 100% y el de la muestra inmunoprecipitada con el anticuerpo IgG como el 0%.

Los fragmentos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 2% con 0,5µg/ml de bromuro de etidio. El análisis de los resultados se realizó mediante el *LightCycler® 480 Software Release v.1.5.0*. Los resultados se expresaron en % respecto al *Input*, considerando el valor del *Input* el 100% y el de la muestra inmunoprecipitada con el anticuerpo IgG como el 0%.

**Tabla 18. Protocolo de la RT-qPCR absoluta para los ensayos de ChIP.** \*La temperatura de hibridación de los cebadores varía en función de su secuencia.

Programa	Temperatura °C	Tiempo	Pendiente (°C/seg)	Adquisición de fluorescencia	
<b>Activación</b>	95	5 min	4,4	No	40 ciclos
<b>Desnaturalización</b>	95	10 seg			
<b>Amplificación</b>	<b>Hibridación*</b>	10 seg	2,2	Simple	
	<b>Extensión</b>	20 seg	4,4		
<b>Curva de fusión</b>	<b>Desnaturalización</b>	1 seg	No	Continuo	1 ciclo
	<b>Unión del Syber G.</b>	15 seg	2,2		
	<b>Tm</b>	98	0,1		
<b>Enfriamiento</b>	40	30 seg	2,2	No	

## **17. ESTUDIO HISTOLÓGICO**

### **17.1 Toma de muestras y fijación del tejido**

Tras la obtención de los hígados procedentes de los animales de experimentación, una porción de tejido se troceó en varias secciones que fueron sumergidas en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7,0 durante un mínimo de 48h, con objeto de fijar y preservar la arquitectura y composición tisular para el estudio histológico.

### **17.2 Deshidratación y aclarado del tejido**

Previamente, las secciones de tejido se dispusieron en el interior de unos soportes o casetes de plástico adecuados y fueron sometidas a un proceso de deshidratación, sustituyéndose el agua por un solvente orgánico para que el tejido quedase correctamente embebido en el medio de infiltración (parafina). El proceso de deshidratación se desarrolló en un sistema automatizado, compuesto por diversos depósitos y un sistema de transporte regulado por un programador horario para transportar la muestra desde un depósito hasta el siguiente. La deshidratación se inició con dos inmersiones en paraformaldehído al 4%, seguidas de inmersiones en etanol de gradación creciente: 70%, 80%, 96% y 3 inmersiones de 100%. Cada inmersión fue de, aproximadamente, 1h y se realizó a TA.

Finalizado el proceso de deshidratación, y dado que la parafina no es soluble en alcohol 100%, la muestra se transfirió a un depósito conteniendo xilol, el cual es miscible tanto con el alcohol 100% como con la parafina. Tras ser sometida a dos inmersiones en xilol, de 1h de duración cada una y a TA, la muestra se transfirió a un depósito de parafina líquida a 58°C, donde se mantuvo hasta la formación de los bloques.

### **17.3 Montaje de los bloques de parafina**

Tras el proceso anterior, las muestras de tejido contenidas en los casetes fueron transferidas a unos moldes de plástico que se rellenaron de parafina líquida mediante el empleo de un dispensador de parafina *EG1120*. A continuación, los moldes se colocaron sobre una placa fría para la solidificación del bloque. Finalmente, los bloques se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos, 24h, antes de comenzar a cortarlos.

### **17.4 Corte histológico**

Los cortes se realizaron con ayuda del microtomo de parafina *RM2255*. Brevemente, se refinaron los bloques de parafina, realizándose cortes de  $20\mu\text{M}$  de espesor hasta que la cuchilla alcanzó el borde del tejido. A partir de este momento, se realizaron secciones de  $4\mu\text{M}$  de espesor, transfiriendo los cortes obtenidos a un baño con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada a  $37^{\circ}\text{C}$  para eliminar las posibles arrugas y pliegues. Transcurridos unos minutos y una vez estirados, los cortes se recogieron con ayuda de un portaobjeto de vidrio recubierto de poli-L-lisina y se colocaron en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, para secarlos.

### **17.5 Tinción con Hematoxilina-Eosina**

La tinción de hematoxilina, por ser de naturaleza básica, colorea en tonos azul y púrpura las estructuras ácidas (basófilas) tales como el núcleo celular. Como colorante de contraste de la hematoxilina se emplea la eosina. Por su naturaleza ácida, la eosina tiene la propiedad de teñir en tonos rosa componentes celulares básicos (acidófilos) como el citoplasma y los componentes extracelulares.

Previamente a la tinción, se llevó a cabo una desparafinación rápida del tejido sumergiendo la muestra en xilol durante 15min, seguida de una rehidratación con un baño de alcoholes de gradación descendente (100% - 100% - 96% - 70% -  $\text{H}_2\text{O}$  destilada), con una duración de 5min cada inmersión. A continuación, la muestra se

sumergió durante 20min en la solución de hematoxilina y se lavó en agua del grifo durante 5min, hasta eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, la muestra se introdujo durante 1 segundo en una solución de HCl1N y se incubó durante 1min en una solución azuleante. La muestra se lavó en agua del grifo durante 5min y se tiñó con eosina 5% durante 3min. Después de un lavado de 5min con H<sub>2</sub>O del grifo para retirar el exceso del colorante, la muestra se deshidrató empleando baños de alcoholes de gradación ascendente (96% - 100% - 100%), manteniéndola durante 1min en cada solución y terminando con dos baño de xilol. La muestra permaneció sumergida en xilol hasta que se procedió al montaje Eukkit. Para ello, se añadió sobre el corte unas gotas de medio de montaje y se colocó encima un cubreobjetos, haciendo una leve presión hasta conseguir el sellado. Las muestras fueron valoradas en el microscopio óptico.

## **17.6 Tinción con Tricrómico de Masson**

El tricrómico de Masson es la tinción más utilizada para evaluar la fibrosis hepática. Se trata de una tinción que nos permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I, que forman fibras gruesas capaces de dar resistencia. Para el desarrollo de esta técnica se emplean los colorantes hematoxilina, fucsina y azul de anilina, que permiten diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno, respectivamente. Así, el núcleo celular se observa de color azul-negro, el citoplasma y las fibras musculares de color rosa, el tejido conjuntivo se colorea de verde, el tejido muscular aparece en verde pardo y los eritrocitos se tiñen de color rojizo.

Tras el proceso de desparafinado e hidratación del tejido, siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior, la muestra se tiñó con hematoxilina de Weigert (solución A y solución B en proporción 1:1) durante 4min, y se lavó con agua del grifo durante 5min. A continuación, se tiñó con una solución de fucsina 0,5% durante 10min y se volvió a lavar nuevamente con agua del grifo. La muestra se incubó

5min con una solución de ácido fosfomolibdico 1% para favorecer la posterior tinción del colágeno. Seguidamente, se sumergió de forma consecutiva en una solución de azul de anilina, agua del grifo, ácido acético 1% y ácido acético 1% en alcohol absoluto, con una duración de 5min cada inmersión. Finalmente, se llevó a cabo la deshidratación de la muestra con un baño ascendente de alcoholes y se procedió al montaje de la misma con medio de montaje, de la misma forma descrita en la sección 17.5. Las muestras fueron valoradas en el microscopio óptico.

### **17.7 Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica es un procedimiento que nos permite identificar proteínas en secciones de tejido basándose en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos correspondientes que se pretende identificar. El anticuerpo puede ir directamente unido a un fluorocromo o enzima capaz de transformar un sustrato en visible durante la fase de revelado, o dicho fluorocromo o enzima ir unidos a un anticuerpo secundario con capacidad para reconocer y unirse a un anticuerpo primario. Aplicado a muestras de tejido incluidas en parafina, este procedimiento permite identificar la localización tisular o citológica de un antígeno mediante microscopía óptica.

La inmunohistoquímica se realizó sobre secciones tisulares de hígado de rata de 4 $\mu$ M de espesor. Previamente, la muestra se desparafinó sumergiéndola en 3 baños de xilol (5min/inmersión). A continuación, se rehidrató con un baño de alcoholes de gradación decreciente (100% - 96% - 70%, 5min cada uno) y se lavó con H<sub>2</sub>O durante 10min. Posteriormente, la muestra fue sometida a un baño con tampón citrato (*ChemMate™ Target Retrieval Solution pH 6.0*) a 100°C durante 20min, para desenmascarar los antígenos. Tras lavarla con H<sub>2</sub>O durante 2min, la muestra se depositó en el aparato automático *Autostainer*, donde se realizaron los siguientes pasos: 1) incubación de

10min con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear las peroxidasas endógenas; 2) incubación con el anticuerpo anti-CD68 (dilución 1:50; sc-59103) durante 30min; 3) lavado de 5min con PBS; 4) incubación con el anticuerpo secundario conjugado con un polímero marcado con HRP durante 30min; 5) incubación de 15min con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) y contratinción con hematoxilina durante 8min; 6) lavado de 5min con H<sub>2</sub>O. Posteriormente, la muestra se deshidrató siguiendo los pasos inversos a la rehidratación y se montó el cubreobjetos como se describe en la sección 17.5. La valoración de las muestras se llevo a cabo con ayuda de un microscopio óptico.

## **18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  errores estándar de un mínimo de 3 experimentos independientes. En el caso de un tamaño muestral menor a 30, previamente se comprobó la normalidad de los valores mediante la prueba de Shapiro y Wilk, aplicándose el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para la comparación de medias entre 3 o más grupos. Cuando este método mostraba diferencias estadísticamente significativas se aplicó el test Dunnett's T3 como análisis de comparaciones múltiples post-hoc. Para la comparación de medias entre dos grupos se utilizó el test no paramétrico de U de Mann-Whitney.

Cuando se tuvo un tamaño muestral mayor o igual a 30 y teniendo en cuenta que las variables de medida fueron cuantitativas se aplicó un test ANOVA para la comparación de medias entre 3 o más grupos. En este caso, al obtener diferencias significativas estadísticamente, se aplicó el test LSD de Fisher. Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó el test paramétrico t de Student.

En cualquier caso, en los contrastes de hipótesis el nivel de significación para la aceptación de la hipótesis nula se fijó en un valor



de  $p \leq 0,05$ . Los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo control, se representaron con “a” o “\*”. Aquellos grupos que mostraron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo GCDCA se representaron con “b”. Todos los test y cálculos fueron realizados con el paquete estadístico StatView 5.0 (SAS Instituto, Inc.) y SPSS 15.0 (IBM) para Windows®7.

## **19. REDACCIÓN Y PRESENTACION GRAFICA**

La redacción de esta tesis doctoral así como la elaboración de las gráficas y figuras han sido elaboradas con el software incluido en el paquete informático *Microsoft Office® 2007* (Microsoft) y el software de aplicación gráfica *SigmaPlot v.11*.





## **V. RESULTADOS**

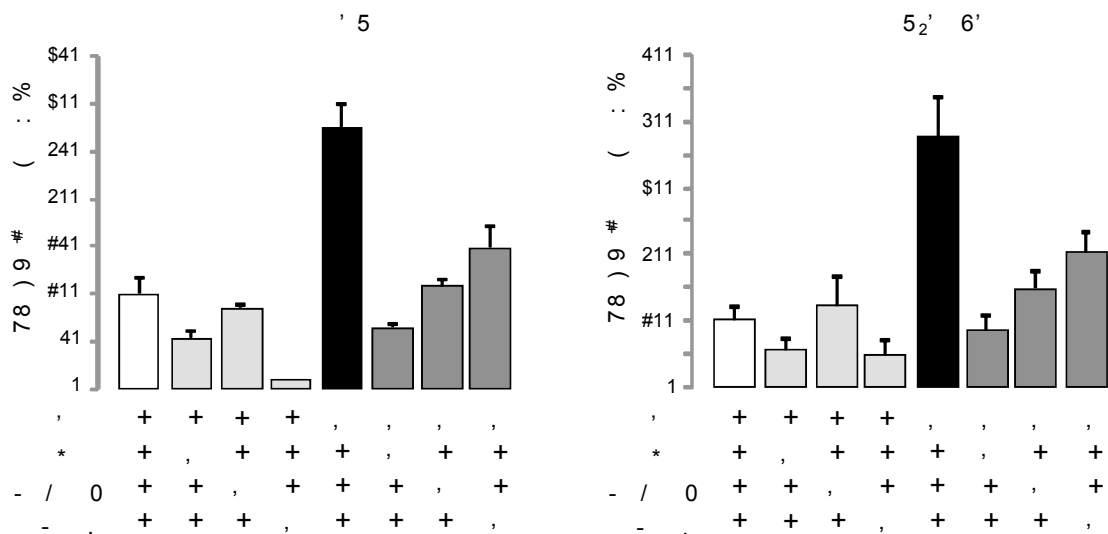


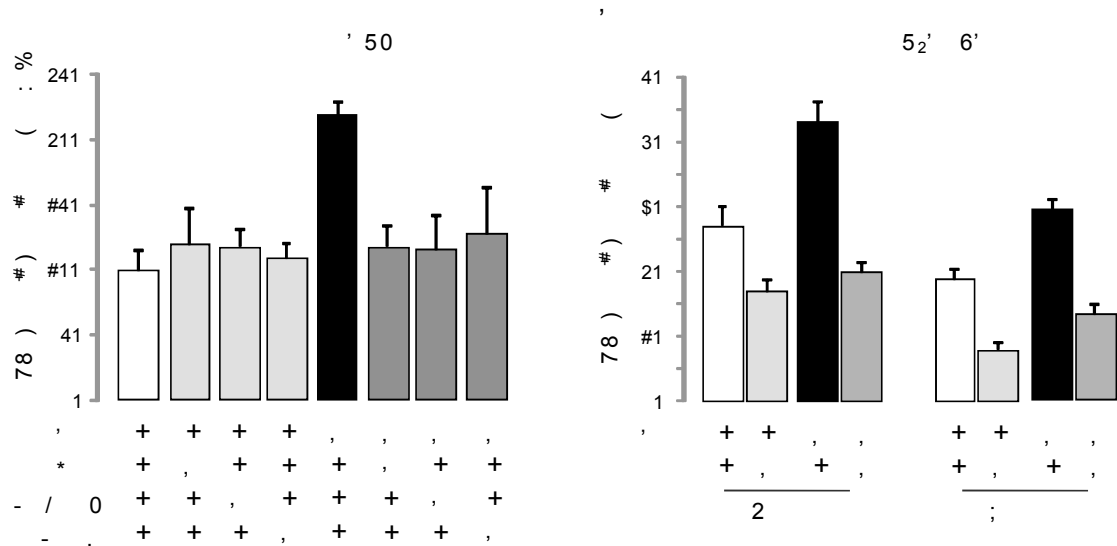
# 1. ESTRÉS OXIDATIVO Y MUERTE CELULAR DURANTE LA COLESTASIS ( )#\* ( + , -

## 1.1 GCDCA induce muerte celular asociada a estrés oxidativo y la desregulación del sistema antioxidante

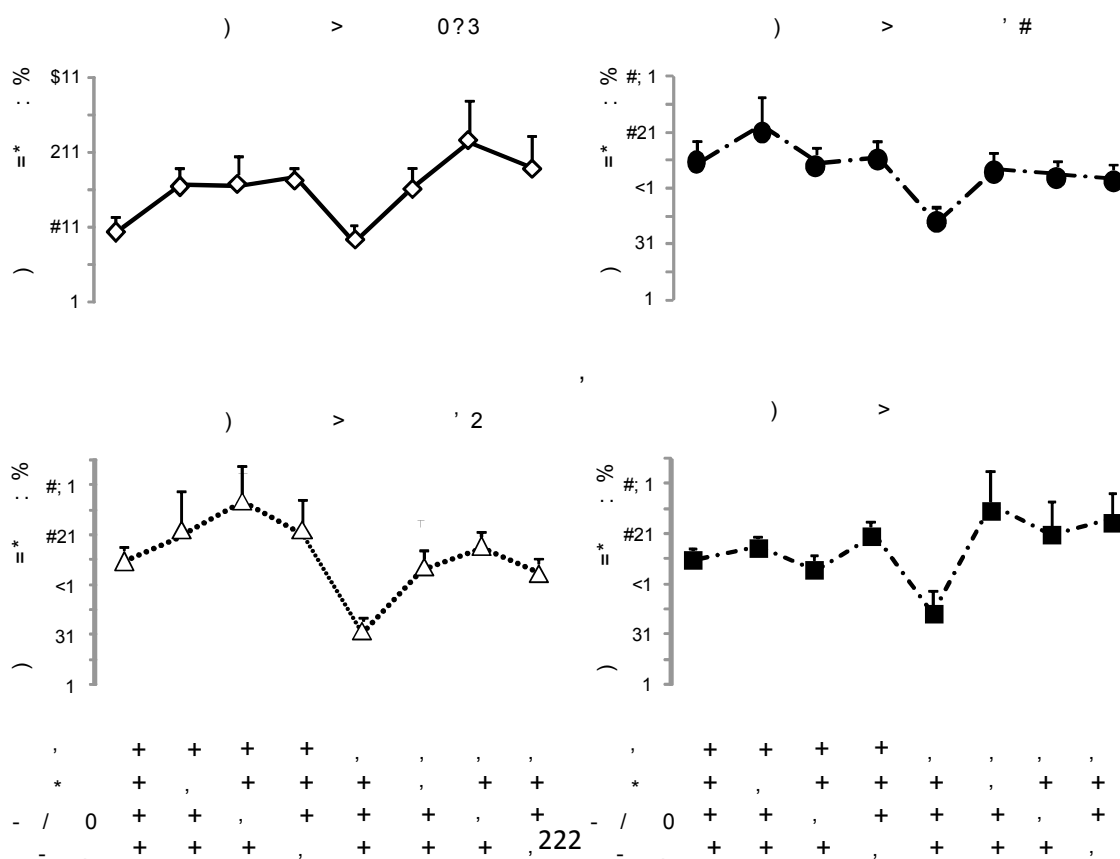
La administración de GCDCA se relacionó con un aumento del estrés oxidativo, detectado a través de la oxidación de las sondas DHE, H<sub>2</sub>DCFDA y ADHP en las células HepG2 (Fig.49A, 49B y 49C), y con la reducción de la expresión de los genes antioxidantes SOD1, SOD2 y catalasa (Fig.50). Este fenómeno coincidió con una mayor actividad caspasa-3 y liberación de LDH al medio de cultivo extracelular, los cuales son parámetros relacionados con la apoptosis y necrosis celular, respectivamente (Fig.51).

**Fig.49. GCDCA induce estrés oxidativo en las células HepG2.** Producción general de EROs cuantificada mediante las sondas (A) DHE y (B) H<sub>2</sub>DCFDA y (C) ADHP, tras 6h de la administración de GCDCA (n=3). NAC, MnTBAP y MitoQ se coadministraron con GCDCA. (D) Cuantificación de la oxidación de H<sub>2</sub>DCFDA por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante preincubación con catalasa. La producción de EROs se determinó a las 2h y 6h de la administración de GCDCA. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o frente al grupo GCDCA ("b").

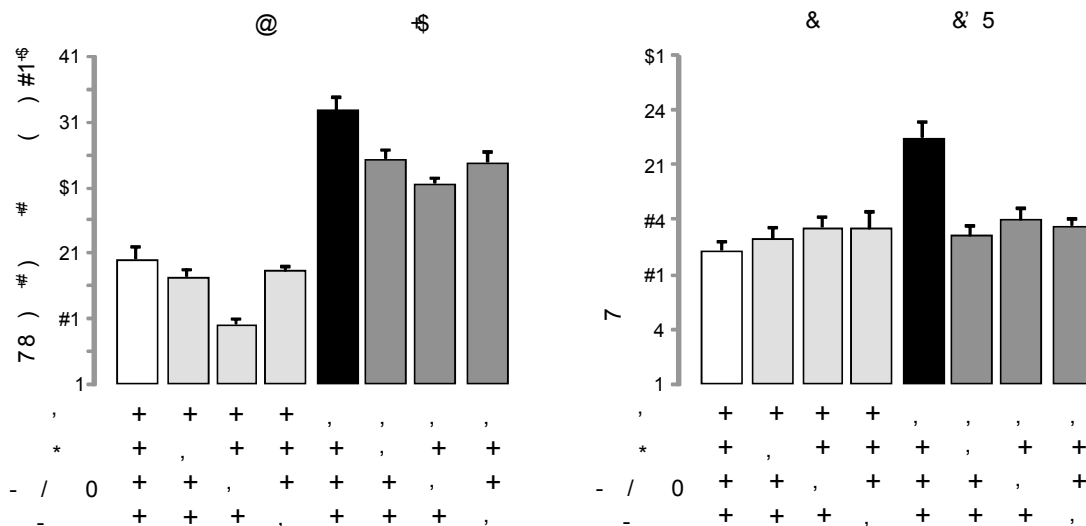




**Fig.50. GCDCA induce alteraciones en el sistema antioxidante celular.** Cuantificación de la expresión de los genes GPX4 (A), SOD1 (B), SOD2 (C) y catalasa (D) (n=6), tras 6h de la administración de GCDCA. NAC, MnTBAP y MitoQ se coadministraron con GCDCA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control (“a”) o frente al grupo GCDCA (“b”).



**Fig.51. La administración de GCDCA incrementa la muerte celular.** La muerte celular se determinó a las 24h de la administración de GCDCA, a través de la actividad caspasa-3 (n=5) (A) y la liberación de LDH al medio de cultivo (n=4) (B). NAC, MnTBAP y MitoQ se coadministraron con GCDCA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control (“a”) o frente al grupo GCDCA (“b”).



Como era de esperar, la administración de catalasa en condiciones basales disminuyó la oxidación de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA a lo largo del tiempo. Además, la actividad peroxidasa de la enzima reveló que, aproximadamente, el 50% de la oxidación de H<sub>2</sub>DCFDA ocurrida durante la citotoxicidad por GCDCA fue promovida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig.49D).

De manera similar, tratamiento con NAC, MnTBAP y MitoQ redujo de forma significativa la acumulación de EROs (Fig.49) y restauró la expresión de los genes SOD1, SOD2 y catalasa en presencia de GCDCA (Fig.50). Como consecuencia, el tratamiento antioxidante protegió frente al daño hepatocelular inducido por la sal biliar, disminuyendo la muerte celular por apoptosis y necrosis (Fig.51).

## 1.2 GCDCA altera la actividad del sistema OXPHOS

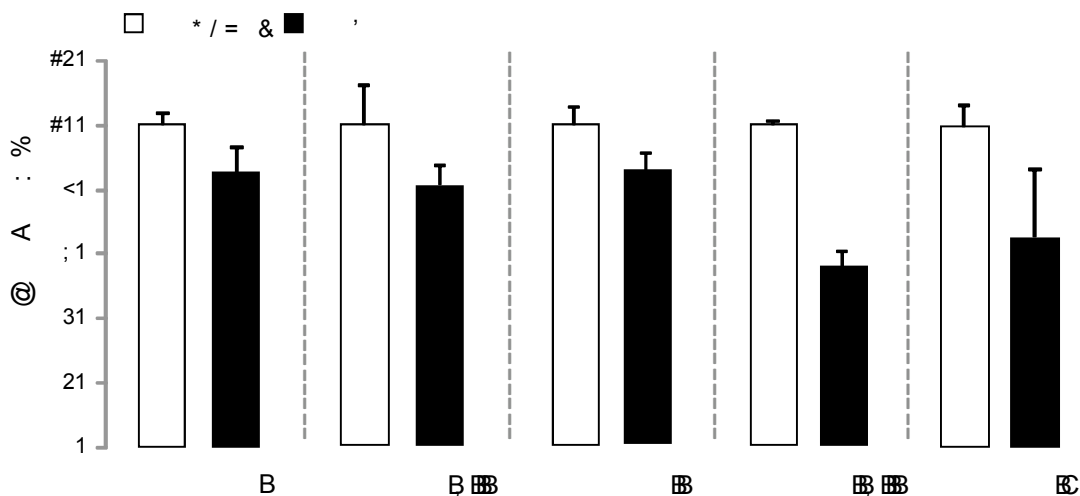
Con el objetivo de identificar la fuente de estrés oxidativo celular en nuestro modelo de colestasis experimental *in vitro*, a continuación



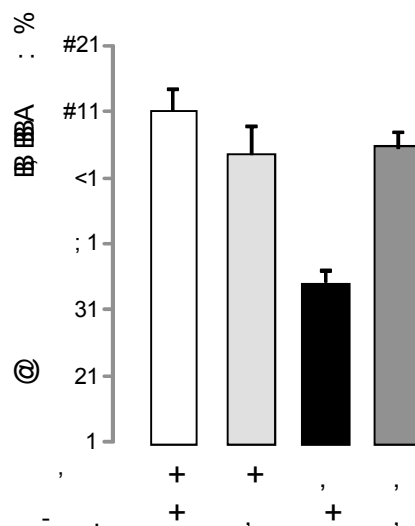
analizamos la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en condiciones basales y tras la administración de GCDCA. Debido a las reacciones de oxido-reducción que en ella tienen lugar, y a que el O<sub>2</sub> es el aceptor final en dicho sistema, la CTE es considerada la principal fuente de producción de EROs y, por tanto, de estrés oxidativo celular.

Los resultados revelaron que la administración de GCDCA no modificaba la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales CI, CII y CIV, así como la actividad combinada de los complejos CI+CIII. Sin embargo, GCDCA sí causó una importante disminución, cercana al 50%, de la actividad combinada de los complejos CII+CIII (Fig.52). El tratamiento con ubiquinona, a través de la administración de MitoQ, restauró de manera significativa la actividad combinada CII+CIII durante la colestasis *in vitro* (Fig.53), revelando un defecto en el flujo de electrones entre los complejos mitocondriales CII y CIII como consecuencia de la acumulación de GCDCA, y no una deficiencia en la actividad aislada del CII ó CIII.

**Fig.52 Actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en células HepG2 tratadas con GCDCA.** Actividad de los complejos I, I+III, II, II+III y IV. La actividad citrato sintasa (CS) se usó como normalizador. Parámetros determinados 6h tras la administración de GCDCA. Los resultados se expresaron como media ± error estándar (n=6). (a) diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) frente al grupo control.



**Fig.53. MitoQ recupera la actividad combinada CII+CIII durante la colestasis**. MitoQ se coadministró con GCDCA 6h antes de la obtención de las mitocondrias. La actividad citrato sintasa (CS) se empleó como normalizador. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (n=6). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o al grupo GCDCA ("b").



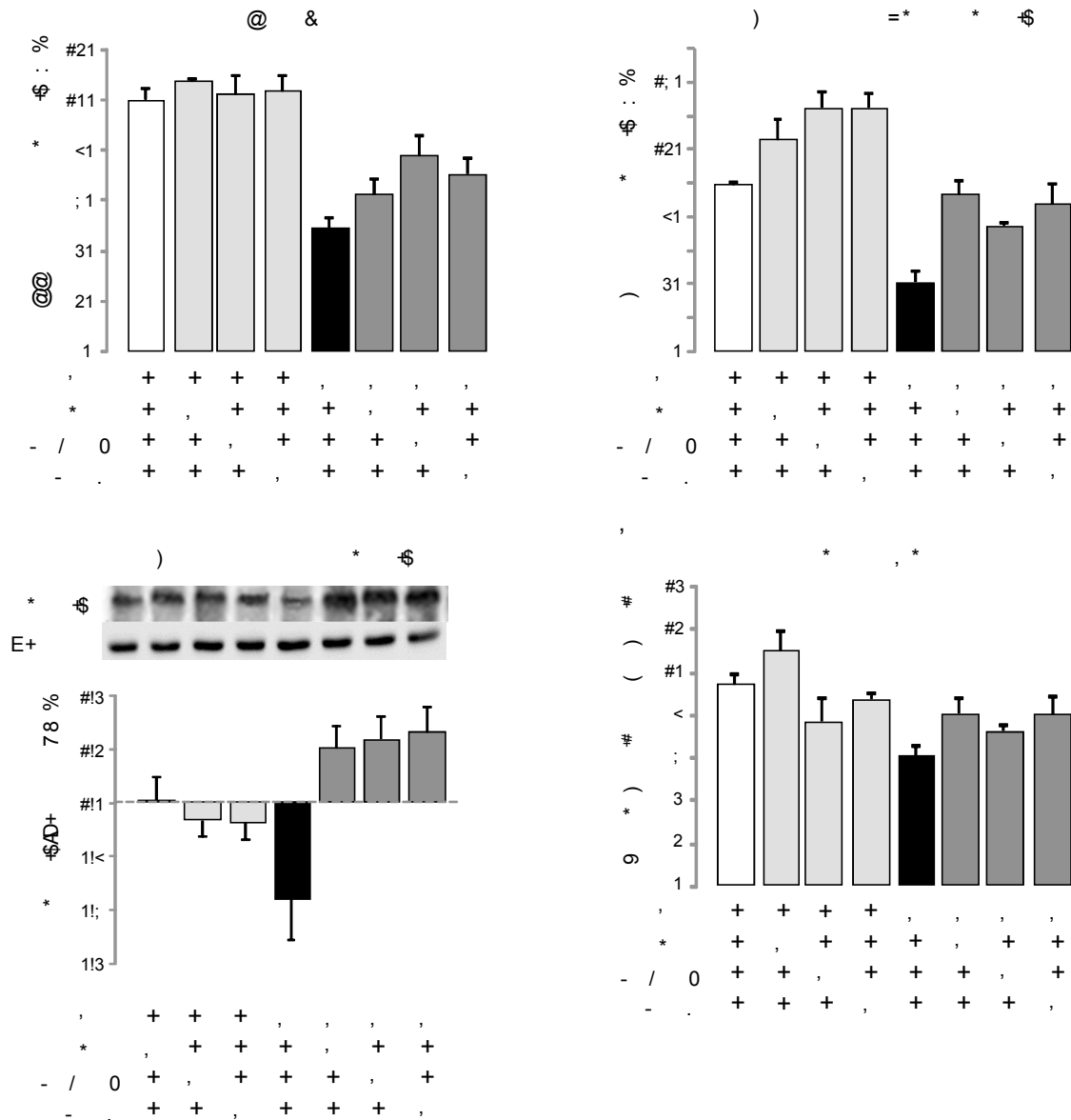
### 1.3 El estrés oxidativo inducido por GCDCA regula negativamente la actividad transcripcional de NOS-3

Una vez establecida la relación entre la acumulación de la sal biliar y la generación de estrés oxidativo en nuestro modelo de colestasis *in vitro*, y considerando el efecto de este último sobre la regulación de NOS-3, a continuación analizamos la actividad transcripcional de NOS-3 durante la administración de GCDCA. Como muestra la Fig.54, la inducción de daño hepatocelular por GCDCA se relacionó con la disminución de la actividad transcripcional del pNOS-3 (Fig.54A) y, consecuentemente, la reducción de la expresión de NOS-3 a nivel de transcrito (Fig.54B) y de proteína (Fig.54C). Esto se tradujo en una menor actividad NOS, cuantificada como la acumulación de los productos finales de la oxidación del ON, nitritos y nitratos (Fig.54D).

El tratamiento con NAC, MnTBAP y MitoQ revertió los efectos que GCDCA provocó en relación a la actividad del promotor y la expresión y actividad de NOS-3. Así, el tratamiento con los antioxidantes recuperó la actividad del pNOS-3 (Fig.54A), los niveles de expresión de NOS-3 (Fig.54B y 54C) y la producción de ON (Fig.54D). Cabe destacar que el incremento de la actividad pNOS-3 inducido por NAC en condiciones de citotoxicidad por GCDCA, pese a no alcanzar la significación estadística

(Fig.54A), causó un efecto similar al del resto de antioxidantes sobre los parámetros descritos anteriormente.

**Fig.54. Efecto del estrés oxidativo inducido por GCDCA sobre la expresión y actividad de NOS-3.** (A) Actividad del promotor NOS-3 en las células pGL4-NOS-3 (n=4). (B) Expresión génica de NOS-3 (n=4). (C) Expresión proteica de NOS3 (n=3). (D) Acumulación de los productos finales de la oxidación del ON en el medio de cultivo (n=3). Los parámetros se determinaron a las 6 h (A), 12 h (B) y 24 h (C y D) de la administración de GCDCA. NAC, MnTBAP y MitoQ se coadministraron con GCDCA. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o frente al grupo GCDCA ("b").

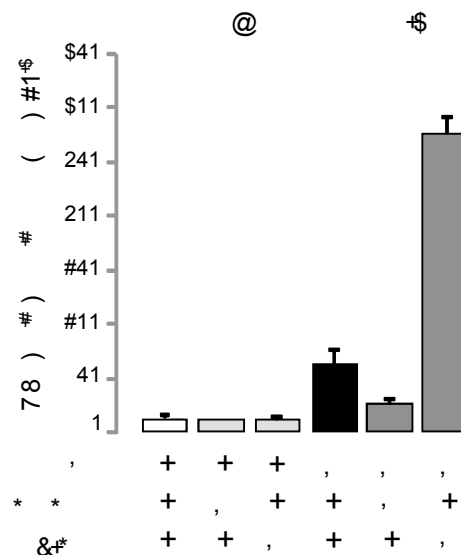


## 1.4 La inhibición de la actividad de NOS-3 durante la colestasis se relaciona con la muerte celular

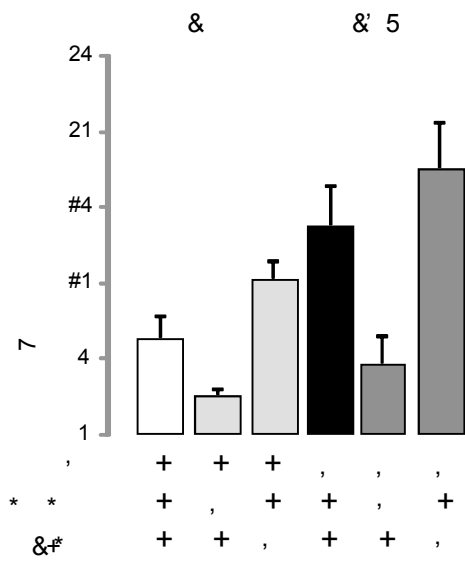
Antes de valorar la relación existente entre la actividad NOS-3 y la supervivencia celular en nuestro modelo de colestasis *in vitro*, analizamos la expresión génica de las otras isoformas de NOS. Tras el análisis, no se detectó expresión de NOS-1 ó NOS-2 en nuestras condiciones experimentales.

La síntesis de ON por la NOS es esteroespecífica y los análogos de la L-arginina, además de no ser sustratos de la reacción, pueden inhibirla de manera competitiva. Cuando analizamos la posible relación entre la producción de ON y la muerte celular, observamos como la inhibición de la actividad NOS mediante el análogo L-NAME incrementaba significativamente la actividad caspasa-3 en las células tratadas con GCDCA. Por el contrario, la administración de un donador exógeno de ON como el NONOate, favorecía la supervivencia celular al suplir, aparentemente, las deficiencias de ON generadas durante la citotoxicidad ejercida por la sal biliar (Fig.55A).

**Fig.55A. Efecto del L-NAME y NONOate en la muerte celular inducida por GCDCA.** La apoptosis celular se determinó mediante el análisis espectrofotométrico de la actividad caspasa-3 en los lisados celulares obtenidos tras 24h de incubación con GCDCA (n=5). L-NAME y NONOate fueron administrados 2h antes que GCDCA. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente a los grupos control ("a") y GCDCA ("b").



De manera similar, en presencia de L-NAME, el porcentaje de LDH liberado al medio de cultivo aumentó en condiciones basales y durante el tratamiento combinado con GCDCA, aunque las diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística respecto a su grupo control. De nuevo, el tratamiento con NONOate redujo de manera significativa la muerte celular por necrosis durante la citotoxicidad ejercida por GCDCA (Fig.55B).



**Fig.55B. Efecto del L-NAME y NONOate en la muerte celular inducida por GCDCA.** La liberación de LDH al medio de cultivo fue cuantificada espectrofotométricamente como medida de la necrosis celular (n=5). La medida se realizó transcurridas 24h desde la administración de GCDCA. L-NAME y NONOate fueron administrados 2h antes que GCDCA. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente a los grupos control (“a”) y GCDCA (“b”).

## 2. MOVILIZACIÓN DE CALCIO DURANTE LA COLESTASIS EXPERIMENTAL ( )#\* (+ , -

Como es sabido, la actividad NOS-3 es calcio-dependiente y, además, su expresión puede ser regulada por la concentración intracelular de este catión. Así pues, una vez establecida la relación entre la actividad NOS-3 y la citotoxicidad inducida por sales biliares, se valoró el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  durante la colestasis experimental *in vitro*.

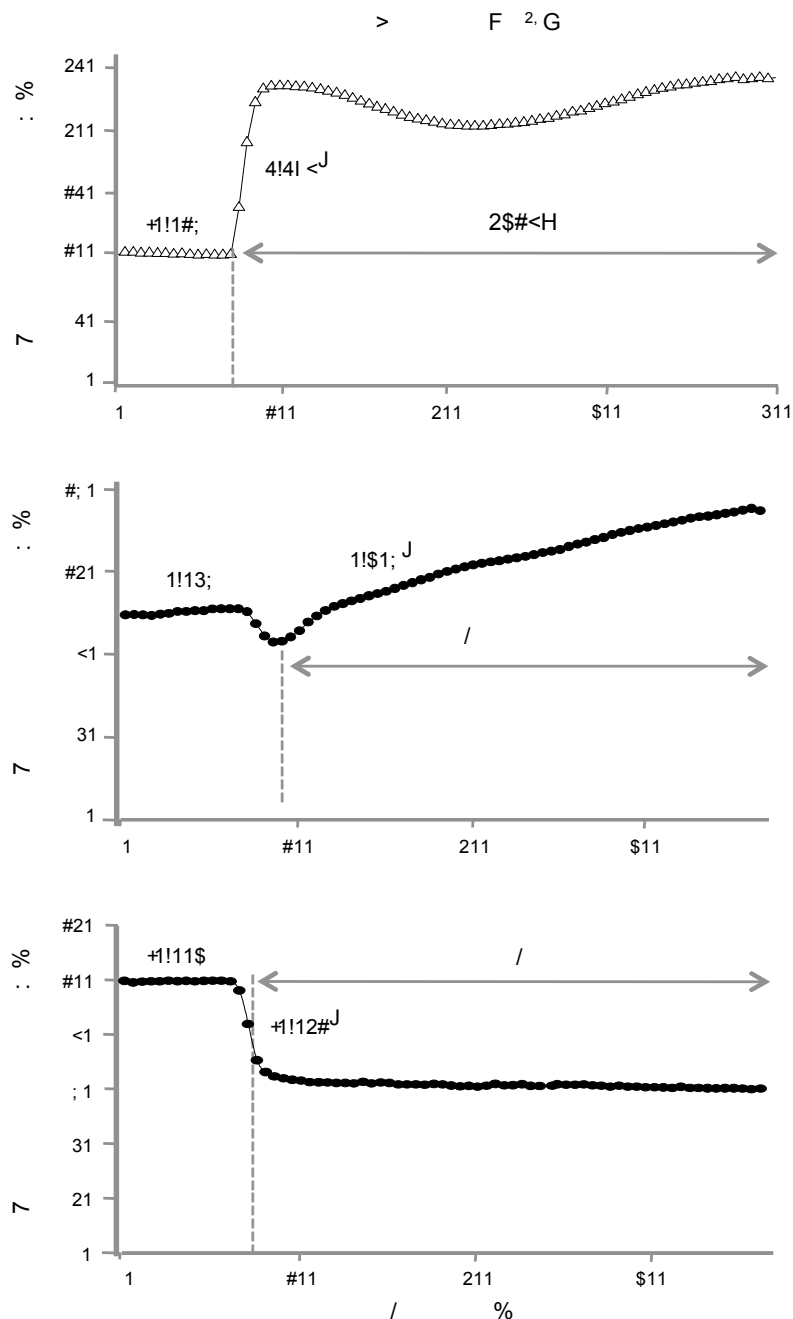
### 2.1 GCDCA induce alteraciones en la cinética de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Para ello, fue necesario analizar la dinámica de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a la administración de GCDCA, mediante el empleo de un sistema de microfluorimetría acoplado a un microscopio de fluorescencia. Previamente, y a modo de controles del ensayo, empleamos los compuestos A23187, tapsigargina y EGTA. A23187 es un ionóforo de cationes divalentes, capaz de formar complejos estables con ellos y actuar como un transportador móvil, permitiendo que dichos iones atraviesen las membranas celulares, las cuales son normalmente impermeables a ellos. De este modo, A23187 es utilizado en investigación para incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células intactas (no permeabilizadas). Tapsigargina, por otro lado, actúa como un inhibidor no competitivo de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarco/endoplasmático (SERCA), aumentando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el citosol al bloquear la capacidad de la célula de bombear  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior del RE/RS. Por último, EGTA es un quelante específico de  $\text{Ca}^{2+}$ , que puede disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  citosólica al secuestrar el ión presente en el medio extracelular.

Mediante el uso de estos compuestos, en primer lugar, se demostró que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel de membrana plasmática y RE funcionaba correctamente en la línea HepG2. Así, la administración de A23187 incrementó significativamente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el 92% de las células estudiadas respecto a la línea base (Fig.56A). Del mismo modo, la tapsigargina aumentó la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el 87% de las células analizadas, al

bloquear la capacidad celular para bombear el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico hacia el RE (Fig.56B). De acuerdo con su naturaleza química, el EGTA impedía la entrada del ión desde el medio exterior, relacionándose su administración con la disminución significativa de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el 92% de la células analizadas (Fig.56C).

**Fig.56. Regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en HepG2.** Cinética de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tras la adición de (A) A23187, (B) tapsigargina y (C) EGTA. Se muestra un perfil representativo de cada experimento (n=4), incluyendo las pendientes obtenidas previa/posteriormente a la adición del compuesto indicado. (\*) diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto a la línea basal.



Una vez puesto a punto el sistema de análisis de la cinética de la  $[Ca^{2+}]_i$ , el siguiente paso fue estudiar la respuesta celular frente a GCDCA, en presencia o no de EGTA o tapsigargina.

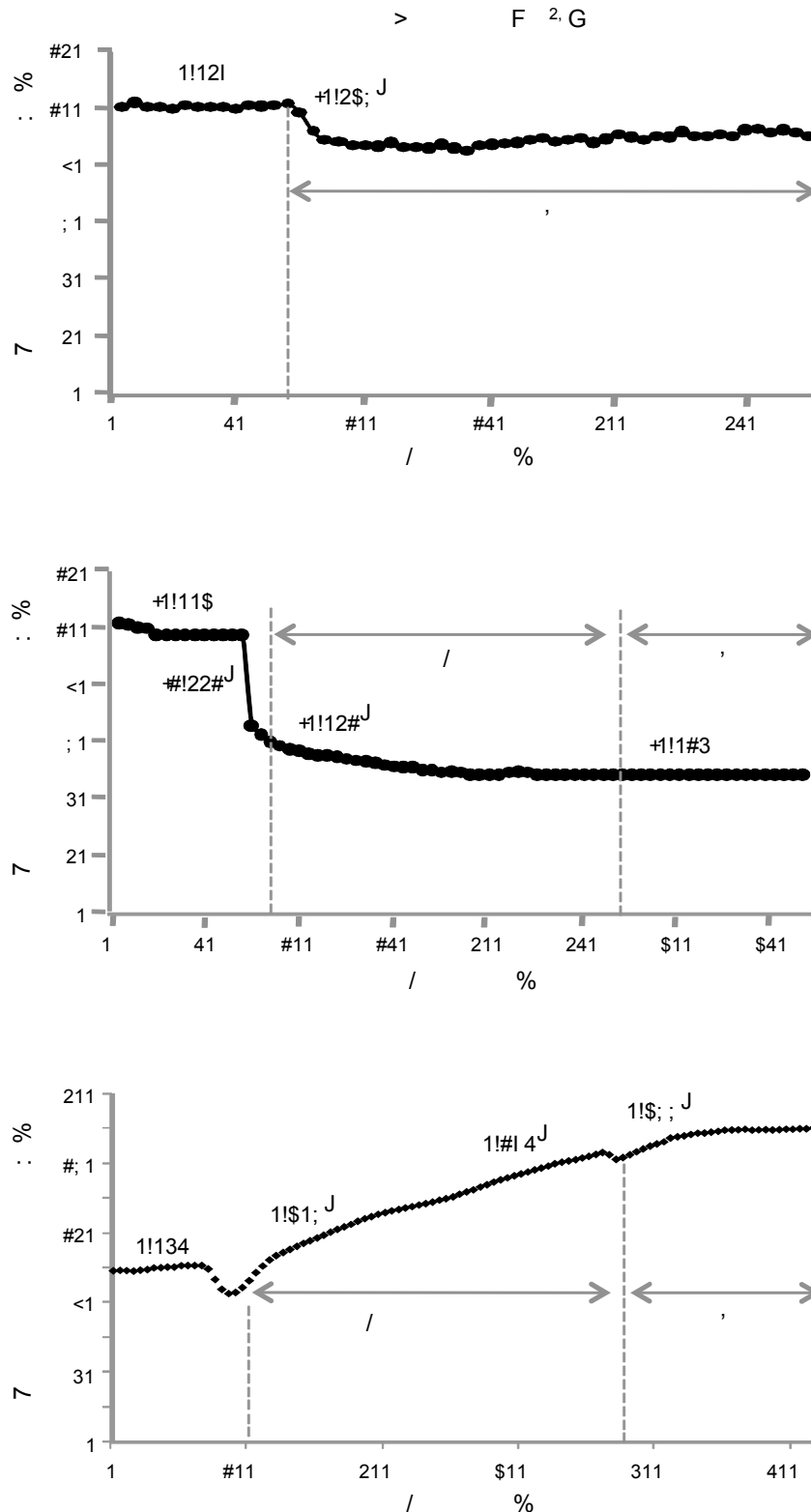
Como muestra la Fig.57A, la administración de GCDCA se relacionó con la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el 73% de las células estudiadas, registrándose un cambio de pendiente de 0,029 a -0,236U.A/s tras la adición de la sal biliar ( $p \leq 0,05$ ). Esta reducción de la  $[Ca^{2+}]$  citosólica podía ser explicada a través del fomento de su salida al medio extracelular, el bloqueo de su entrada al interior celular o mediante su almacenamiento en los depósitos intracelulares.

En presencia de EGTA, la adición de GCDCA no modificó la  $[Ca^{2+}]_i$ , ya disminuida por el quelante (Fig.57B). Esto sugería que GCDCA podía estar ejerciendo su efecto a través del bloqueo de la entrada del catión en la célula; al estar 'secuestrado' el  $Ca^{2+}$  extracelular por EGTA, dicho efecto podría pasar inadvertido.

El pretratamiento con tapsigargina (asociado al incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  a través de la inhibición del almacenamiento del ión en el RE) bloqueó el efecto de GCDCA relativo a la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  en la situación basal (Fig.57C). De hecho, la adición de la sal biliar en estas condiciones causó un breve, pero significativo, aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , observándose un cambio de pendiente de 0,195 a 0,366U.A/s. Estos resultados sugieren que GCDCA no disminuye la  $[Ca^{2+}]_i$  facilitando el bombeo del ión hacia el exterior celular, sino hacia el RE. Esto explicaría la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  observada en condiciones basales tras la adición de GCDCA, así como por qué la sal biliar no solo no reduce la  $[Ca^{2+}]_i$  durante el tratamiento con tapsigargina sino que la incrementa brevemente, al estar la SERCA bloqueada.



**Fig.57. Regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  por GCDCA en HepG2.** Cinética de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la adición de la sal biliar (A), previo tratamiento con EGTA (B) o taspigargina (C). Se muestra un perfil representativo de cada experimento (n=4), incluyendo las pendientes obtenidas previa/posteriormente a la adición del compuesto indicado. (\*) diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre una pendiente y la que le precede.

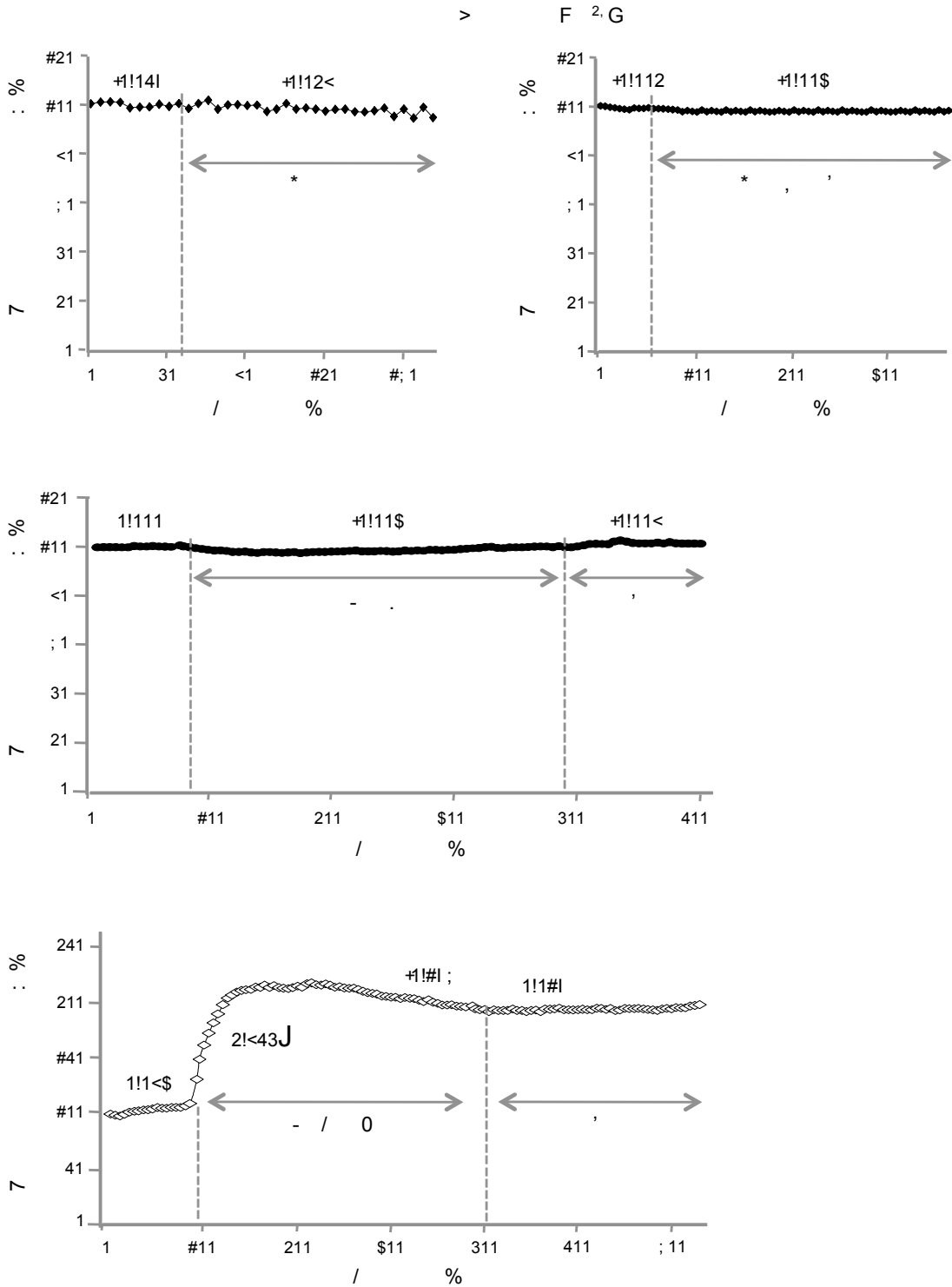


## **2.2 La regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ por GCDCA es dependiente de estrés oxidativo**

Debido a que el estrés oxidativo se relaciona con la homeostasis del calcio celular, y la acumulación de GCDCA está asociada a la generación de dicho estrés, a continuación valoramos si GCDCA participaba en la alteración de la  $[Ca^{2+}]_i$  a través de la generación de EROs. Para ello, volvimos a utilizar el mismo sistema de microfluorimetría, registrando la cinética de la  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia de los antioxidantes NAC, MnTBAP y MitoQ.

Como se muestra en la Fig.58, la administración de los antioxidantes NAC y MitoQ no modificó la  $[Ca^{2+}]_i$  en condiciones basales (Fig.58A y 58B). Por el contrario, el tratamiento con MnTBAP incrementó de manera significativa la  $[Ca^{2+}]_i$  en el 80% de las células analizadas (Fig.58C). Respecto al papel del estrés oxidativo en la regulación de la homeostasis celular del  $Ca^{2+}$  por GCDCA, cabe destacar que la sal biliar falló en inducir los cambios descritos con anterioridad sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  cuando fue administrada con los antioxidantes. Así, la adición de GCDCA al medio de cultivo celular de forma simultánea a NAC (Fig.58A), o inmediatamente después de MitoQ (Fig.58B) o MnTBAP (Fig.58C) no tuvo efecto alguno sobre la movilización celular del  $Ca^{2+}$ . Estos resultados demuestran, por tanto, que el estrés oxidativo es responsable de la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por GCDCA.

**Fig.58. El tratamiento antioxidante inhibe la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por GCDCA.** Cinética de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la adición de la sal biliar (A) en combinación con NAC, o tras la administración de (B) MitoQ o (C) MnTBAP. Se muestra un perfil representativo de cada experimento (n=4), incluyendo las pendientes obtenidas previa/posteriormente a la adición del compuesto indicado. (\*) diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre una pendiente y la que le precede.

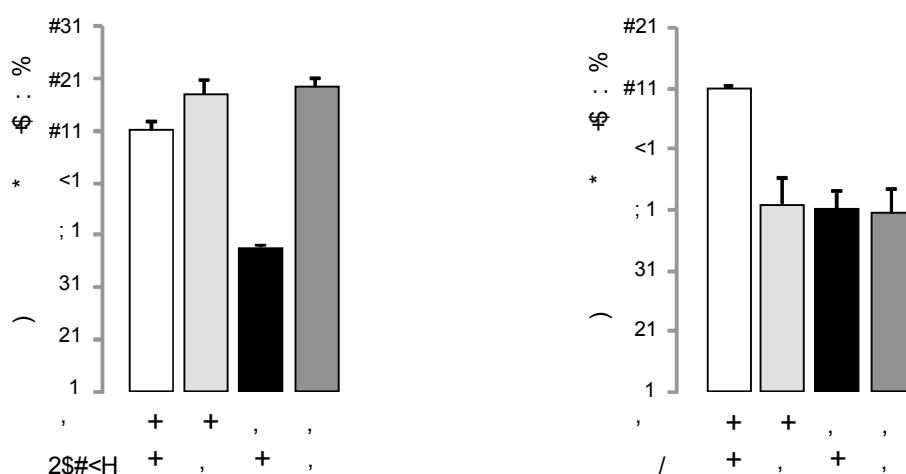


## 2.3 Papel de la $[Ca^{2+}]_i$ en la regulación de NOS-3

Una vez establecido el efecto que ejerce el estrés oxidativo sobre la homeostasis del  $Ca^{2+}$  celular y teniendo en cuenta que ambos factores pueden regular la expresión de NOS-3, a continuación evaluamos dicha relación durante la citotoxicidad inducida por GCDCA.

Los resultados mostraron que la administración del ionóforo de calcio A23187 incrementaba significativamente la expresión de NOS-3 (Fig.59A) de forma paralela a la  $[Ca^{2+}]_i$ . De manera similar, la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  promovida por EGTA disminuyó la expresión de NOS-3 en condiciones basales (Fig.59B). Sin embargo, mientras que el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por A23187 durante la citotoxicidad por GCDCA se relacionó con la recuperación de la expresión de NOS-3 en la línea celular HepG2 (Fig.59A), la administración del quelante de  $Ca^{2+}$  no causó ningún efecto adicional sobre la expresión del transcrito en estas mismas condiciones experimentales (Fig.59B).

**Fig.59. Papel del  $Ca^{2+}$  en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la colestasis experimental.** Expresión génica de NOS-3 durante (A) el tratamiento con A23187 ó (B) EGTA. GCDCA se coadministró con A23187 ó se administró 2h después de EGTA; los parámetros se determinaron transcurridas 12h. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (n=5). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o GCDCA ("b").



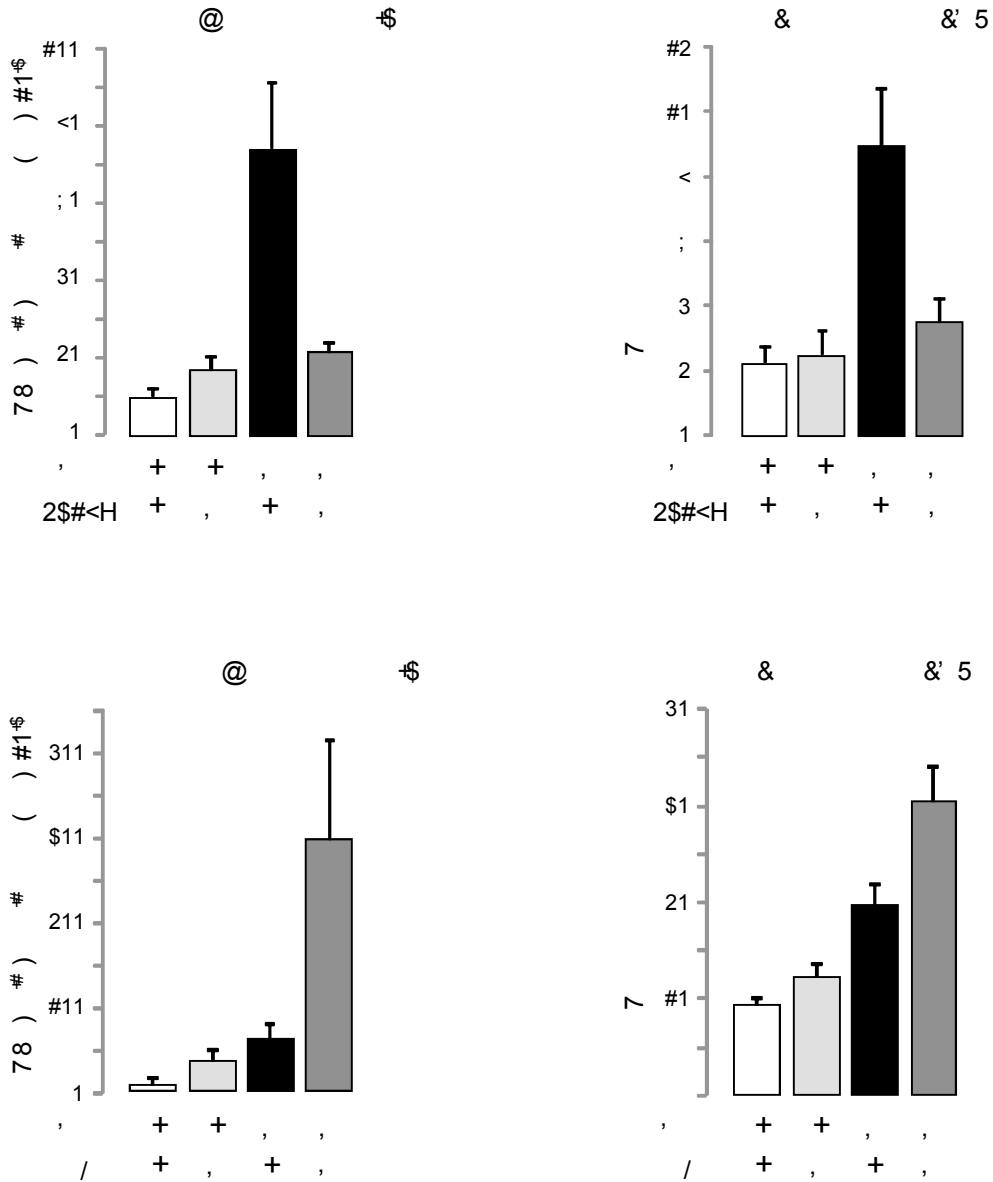
Este resultado demuestra que la expresión de NOS-3 es dependiente de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Además, debido a que la reducción de la expresión de NOS-3 fue la misma tras la administración de GCDCA y de EGTA pese a que ambos compuestos se relacionan con una disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  muy diferente (del 15% y 40%, respectivamente; Fig.57A y 57B), estos resultados sugieren que o bien la expresión de NOS-3 es muy sensible a la  $[Ca^{2+}]_i$  o bien existen otros factores que pudieran estar participando en su regulación durante la citotoxicidad por GCDCA.

## **2.4 Papel de la $[Ca^{2+}]_i$ en la muerte celular inducida por GCDCA**

Para valorar el papel de la  $[Ca^{2+}]_i$  sobre la muerte celular en nuestro modelo de colestasis experimental, se analizó la actividad caspasa-3 y la liberación de LDH al medio extracelular en presencia de A23187 y EGTA. Mientras que la adición de A23187 no causó ningún efecto en la condición basal, sí que redujo de manera muy significativa el incremento en ambos parámetros provocado por la acumulación de la sal biliar (Fig.60A). Por tanto, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el ionóforo de  $Ca^{2+}$  se asoció con la supervivencia celular durante la citotoxicidad promovida por GCDCA.

Respecto a EGTA, cabe destacar que incrementó significativamente la liberación de LDH en condiciones basales. Adicionalmente, la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  asociada al uso del quelante incrementó de manera muy notable los valores de ambos parámetros relacionados con la muerte celular, durante la colestasis *in vitro* (Fig.60B).

**Fig.60. Papel del Ca<sup>2+</sup> en la muerte celular durante la colestasis experimental.** La muerte celular se valoró a través de la actividad caspasa-3 y la liberación de LDH al medio de cultivo. GCDCA se coadministró con A23187 (A) ó se administró 2h después de EGTA (B); los parámetros se determinaron transcurridas 24h. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar (n=5). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control (“a”) o GCDCA (“b”).



### **3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NOS-3 DURANTE LA COLESTASIS EXPERIMENTAL ( )#**

\* ( + , - #

Tras determinar el vínculo existente entre colestasis y muerte celular a través de la regulación transcripcional de NOS-3 por estrés oxidativo, el siguiente paso fue identificar los TFBS en el pNOS-3 que pudieran estar relacionados con la regulación de la expresión de NOS-3 en nuestro modelo experimental.

#### **3.1 Identificación de TFBS candidatos en el pNOS-3#**

Cuando comenzó este estudio no existían evidencias bibliográficas acerca de los factores de transcripción (FTs) involucrados en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la citotoxicidad por GCDCA. Para abordar este objetivo, en primer lugar, fue necesario identificar en el pNOS-3 posibles sitios de unión para FTs. Para ello, se utilizaron tres programas *online* de predicción *in silico* de libre acceso (apartado 14, Material y Métodos), mediante los cuales se realizó el análisis bioinformático de un fragmento de 1,6 Kb del pNOS-3 que precede al codón ATG de inicio (Fig.29, apartado 3.2, Material y Métodos).

Tras el análisis de predicción fueron identificados diversos TFBS para GATA, STATx, AP-1, p300, AML-1a, Sp1, NF-κB, MAZ y NFE2, entre otros. De todos ellos, únicamente fueron seleccionados para su posterior análisis aquellos FTs identificados unánimemente por los tres programas de predicción y capaces de ser regulados por estrés oxidativo. Este criterio de selección redujo considerablemente la lista obtenida, facilitando la elección de los TFBS a analizar. De este modo, se seleccionaron tres sitios de unión para Sp1 y uno para AP-1. La secuencia de estos sitios y su posición dentro del pNOS-3 se resume en la Tabla 19.

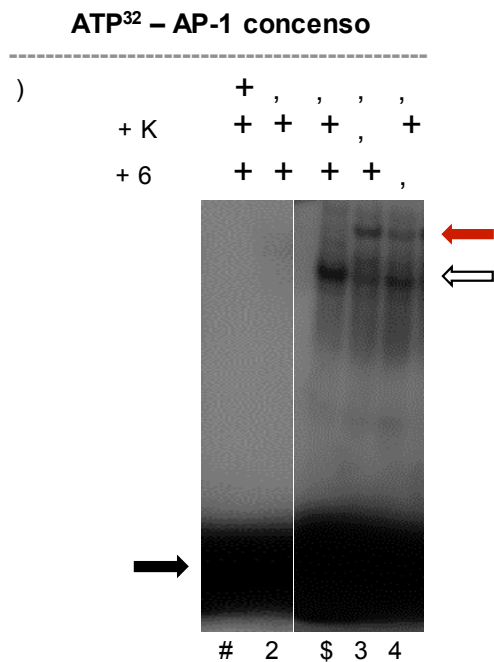
**Tabla 19. Sitios de unión teóricos en el pNOS-3 (1,6Kb) para Sp1 y AP-1.** TFSEARCH, TESS y TF SITE SCAN son las herramientas *online* utilizadas para la predicción de los sitios de unión. ‘Posición’ se refiere a la secuencia del pNOS-3 donde empieza el sitio de unión (Número de acceso del GenBank AF387340.1). K corresponde a G/T, R a A/G.

FT	TFSEARCH		TESS		TFSITESCAN	
	Posición	Secuencia	Posición	Secuencia	Posición	Secuencia
Sp1	-1386	GGGGTGGGGT	-1384	GGTGGG	-1385	CCCACC
	-632	GGGGCTGGGA	-632	KRGGCKRRK	-632	KRGGCKRRK
	-104	GGGGCGGGGC	-104	GGGGCGGGGC	-104	GGGGCGGGGC
AP-1	-666	TTGAGTCAT	-665	TGAGTCA	-665	TGAGTCA

### 3.2 cJun y cFos son subunidades del complejo AP-1

Para confirmar que cJun y cFos son subunidades que conforman el complejo AP1, acudimos al ensayo EMSA radioactivo. Durante el ensayo, el extracto nuclear fue incubado en presencia de los anticuerpos anti-cJun y anti-cFos, previa administración del oligonucleótido comercial marcado radioactivamente y conteniendo el sitio de unión para AP-1 (sonda) (Fig.61).

**Fig.61. Identificación de las subunidades que componen el complejo AP-1.** La autorradiografía del EMSA muestra el retardo provocado por la unión de la sonda con el complejo AP-1 presente en el extracto nuclear (flecha blanca, calle 3) y en presencia de los anticuerpos c-Jun (flecha roja, calle 4) y c-Fos (flecha roja, calle 5). La flecha negra indica la sonda libre. La determinación se realizó 12h tras la administración de GCDCA.





Los resultados demostraron que el complejo ADN-proteína se encontraba retardado en presencia de ambos anticuerpos, confirmando que ambas subunidades se expresaban en nuestra línea celular y tenían capacidad de unión a su TFBS (Fig.61).

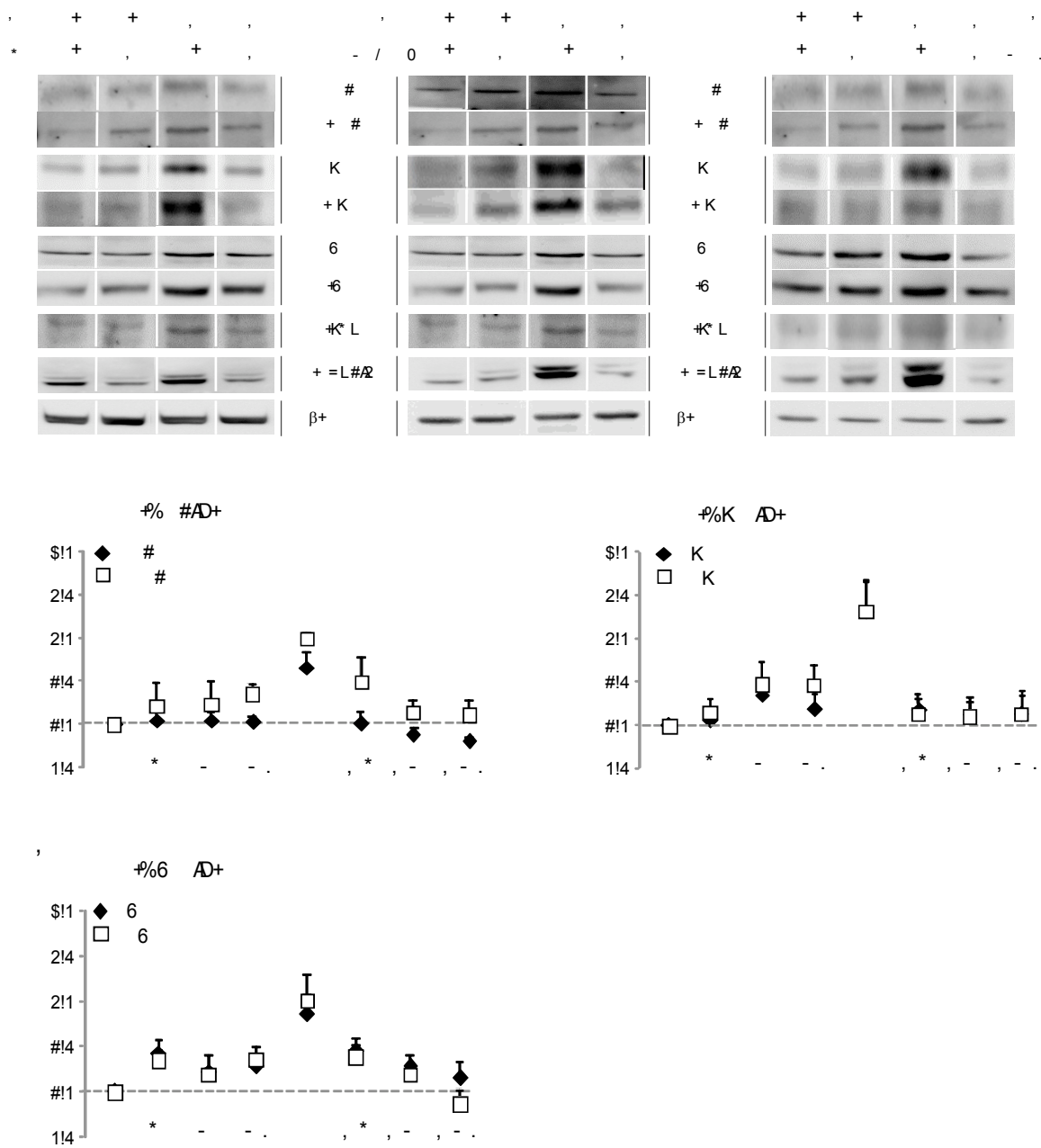
### **3.3 El estrés oxidativo inducido por GCDCA se relaciona con la expresión y activación de Sp1 y AP-1**

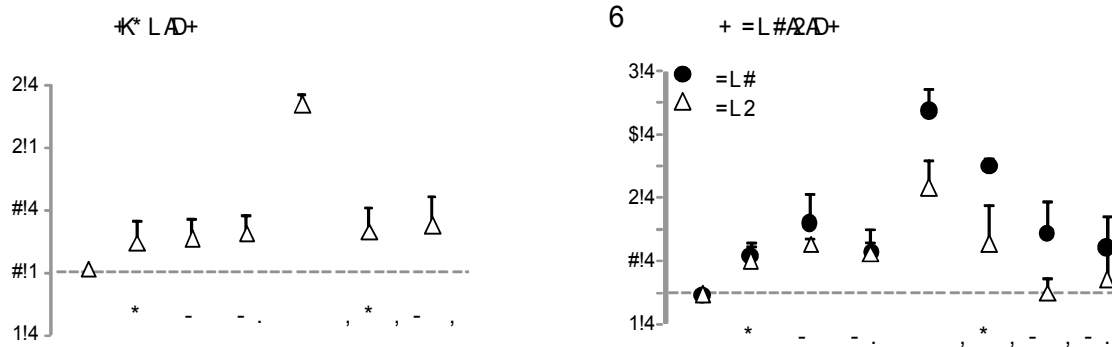
Antes de valorar si se producía la unión física de los FTs seleccionados al pNOS-3, se evaluó la capacidad que tienen dichos factores de ser regulados por las condiciones del estudio. Así, para cada uno de los FTs seleccionados (Sp1 y AP1 -heterodímero compuesto por cJun y cFos-), comparamos su nivel de expresión y de activación (fosforilación) en el lisado celular, antes de y durante el tratamiento con GCDCA, mediante western-blot. Los resultados mostraron que la administración de GCDCA se relacionaba con un incremento significativo de la expresión y estado de fosforilación de las proteínas Sp1, cJun y cFos (Fig.62). Se confirmaba así que Sp1 y AP-1 podrían estar participando en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la citotoxicidad inducida por GCDCA.

Puesto que la expresión y activación de Sp1 y AP-1 puede estar regulada por la vía de las MAPKs, nos propusimos analizar el estado de activación de las quinasas JNK y ERK1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares) en presencia de sales biliares. Como muestra la Fig., la adición de GCDCA incrementó de forma significativa la fosforilación de las MAPKs en las células HepG2.

En concordancia, la protección celular frente al daño oxidativo por sales biliares, mediante el uso de las moléculas NAC, MnTBAP y MitoQ, redujo de forma significativa la expresión y fosforilación de los FTs SP1, cJun y cFos, y la fosforilación de JNK y ERK1/2. En el caso de NAC, a pesar de observarse una reducción en la activación de ERK2, las diferencias no llegaron a alcanzar significación estadística comparado con el grupo de células tratadas con GCDCA (Fig.62).

**Fig.62. Expresión de los FTs y MAPKs en células HepG2 tratadas con GCDCA.** (A) Efecto de la administración de NAC, MnTBAP y MitoQ. Western blot representativo para (p-)Sp1 (n=(4)5), (p-)cJun (n=(4)3), (p-)cFos (n=(4)5), p-JNK (n=3) y p-ERK1/2 (n=3) en lisados celulares. (B-F) Análisis densitométrico de los blots incluidos en (A). “+” indica la administración de GCDCA (“G”) más el tratamiento correspondiente. Los parámetros se determinaron 12h tras la administración de GCDCA. Los antioxidantes se administraron junto a GCDCA. Los resultados se expresan como media ± error estándar. Se indican Las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control (“a”) o frente al grupo GCDCA (“b”).





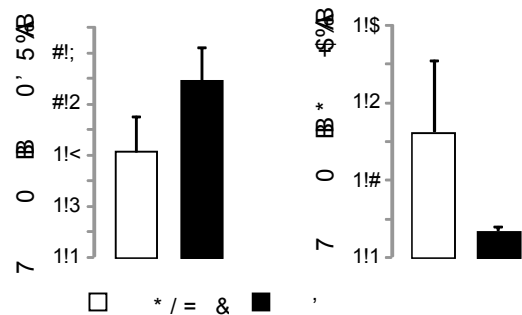
### 3.4 GCDCA aumenta la unión de Sp1 y de AP-1 a sus sitios diana en el pNOS-3

Confirmada la capacidad de los FTs seleccionados para responder a la toxicidad por GCDCA mediante cambios en su expresión/fosforilación, a continuación se valoró la eficacia de Sp1 y AP-1 para unirse al pNOS-3 y regular su actividad. Así, mediante la técnica ChIP, analizamos aquellas regiones del promotor previamente identificadas con los tres programas de predicción (Tabla 19).

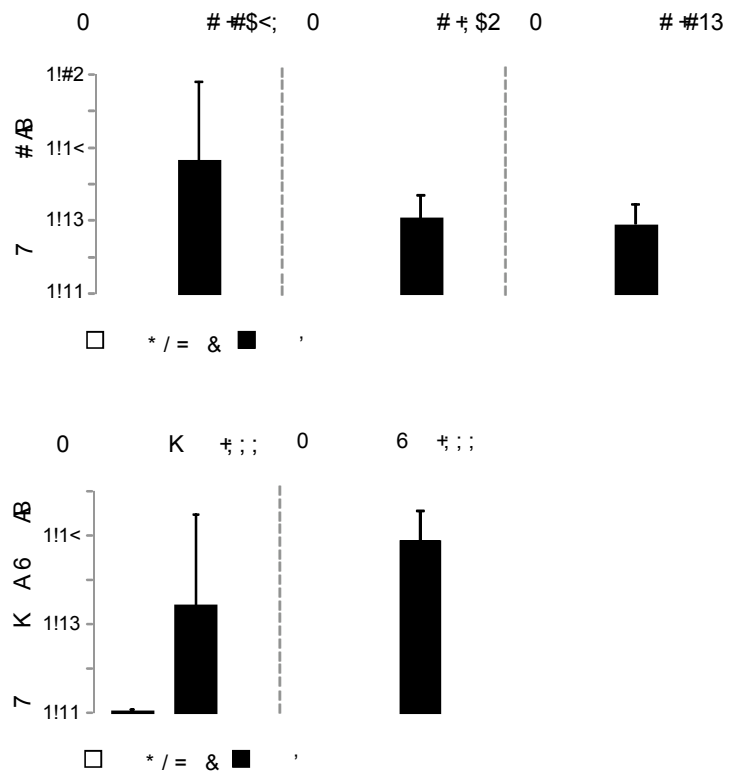
Tras 12h de incubación con GCDCA, y finalizados los diferentes pasos del ensayo (fijación celular, extracción de cromatina, inmunoprecipitación y reversión del entrecruzamiento), se evaluó la capacidad de unión de Sp1, cJun y cFos a los TFBS localizados en el pNOS-3 mediante RT-qPCR. Como control positivo de la inmunoprecipitación y del estado de activación transcripcional del gen NOS-3, realizamos un ensayo en presencia del anticuerpo anti-ARN polimerasa II. Los resultados mostraron como el anticuerpo anti-ARN polimerasa II precipita un fragmento de la región codificante del gen GAPDH y del gen NOS-3 en ambas situaciones, basal (control) y de colestasis experimental (GCDCA) (Fig.63). Como puede observarse en la Fig.63B, la amplificación del fragmento de NOS-3 (equivalente a la expresión del gen) fue significativamente mayor en la condición basal que tras la incubación con GCDCA. La inmunoprecipitación de las muestras de cromatina con el anticuerpo anti-Sp1 reveló la unión del FT en las posiciones -1386, -632 y -104 del pNOS-3 tras la

administración de GCDCA (Fig.64A). Del mismo modo, cuando se utilizaron los anticuerpos anti-cJun y anti-cFos durante la inmunoprecipitación, se detectó la unión de sendos FTs en la posición -666 del pNOS-3 tras la colestasis experimental (Fig.64B). En la situación basal, por el contrario, no se detectó la unión de ninguno de los FTs en las posiciones del pNOS-3 descritas anteriormente (Fig.64).

**Fig.63. Controles empleados durante el ensayo de ChIP.** El anticuerpo anti-ARN polimerasa II se empleó como (A) control positivo del ensayo y (B) para corroborar la actividad transcripcional de NOS-3 (n=3). Los parámetros se determinaron 12h tras la administración de GCDCA. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a").



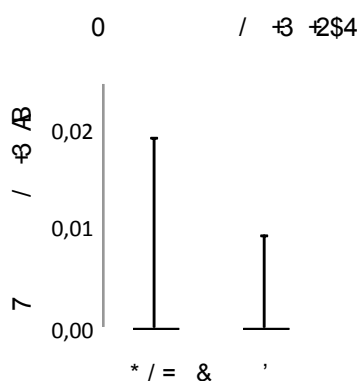
**Fig.64. Unión de los FTs Sp1, cJun y cFos al pNOS-3.** (A) Unión de Sp1 al pNOS-3 en las posiciones -1386, -632 y -104. (B) Unión de cJun y cFos en la posición -666. Los parámetros fueron determinados 12h tras la administración de GCDCA (n=3). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a").



### 3.5 GCDCA no afecta a la unión de los FTs GATA-1/4 y MAZ al pNOS-3

Adicionalmente, durante el análisis de predicción de TFBS en el pNOS-3 identificamos un sitio para GATA-1 (*erythroid transcription factor*), localizado en la posición -235 del promotor. Aunque este sitio no fue considerado para su análisis inicialmente, decidimos incluirlo en el ensayo de CHIP debido a que había sido descrito que miembros de esta familia se unen al pNOS-3 en esta posición y pueden regular su actividad (Zhang et al., 1995). Del mismo modo, y a pesar de no haber sido identificado durante el análisis de predicción *in silico*, también investigamos la participación de GATA-4 en este proceso debido a que este FT es capaz de unirse en la posición -235 de pNOS-3, descrita previamente como región de unión para GATA-1 (Neumann et al., 2004).

El ensayo de inmunoprecipitación reveló que la regulación de la expresión de NOS-3 es independiente de la unión de GATA-4 a la posición -235 del pNOS-3. Así, no se detectó la unión del FT ni en condiciones basales ni en presencia de GCDCA (Fig.65).

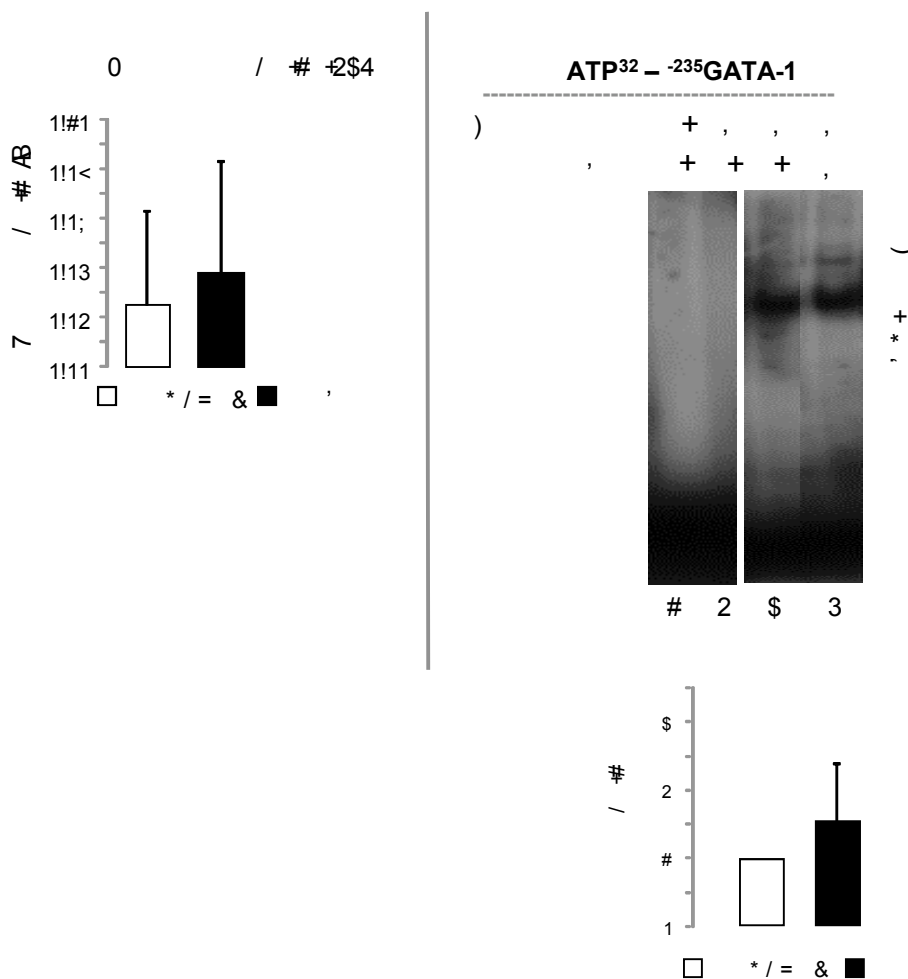


**Fig.65. Unión de GATA-4 a la posición -235 del promotor de NOS-3.** La Figura muestra un enriquecimiento de la unión de GATA-4 en la posición -235 del pNOS-3. La determinación se realizó 12h tras la administración de GCDCA. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar (n=3). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a").

Respecto a GATA-1, el ensayo por CHIP mostró que, si bien existía unión del FT a la posición -235 del pNOS-3, no había diferencias de unión estadísticamente significativas tras la administración de GCDCA

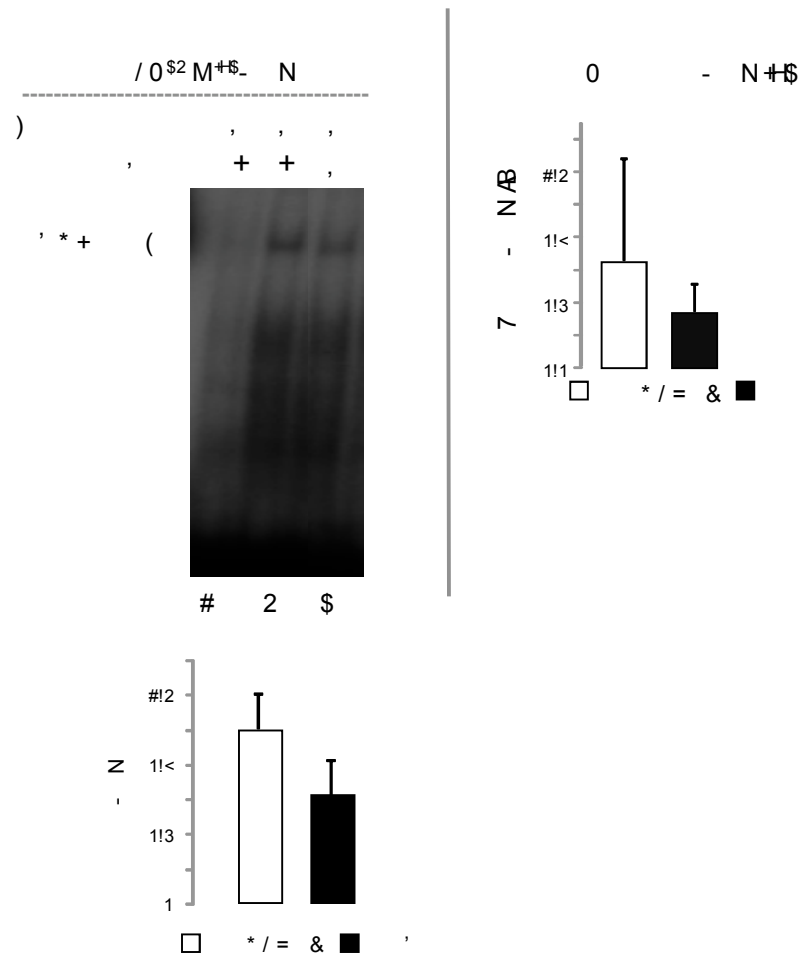
(Fig.66A). Para confirmarlo, realizamos un ensayo de movilidad electroforética empleando una sonda de ADN marcada radioactivamente con ATP<sup>32</sup>, conteniendo el sitio -235 para la unión de GATA-1. Como se observa en la Fig.66B y 66C (calles 3 y 4), la administración de GCDCA no modificó la unión de GATA-1 al ADN respecto a la condición basal.

**Fig.66. Unión de GATA-1 a la posición -235 del promotor de NOS-3.** Se evaluó mediante (A) la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y (B) el ensayo de movilidad electroforética (EMSA). En (B) se muestra una autorradiografía de un EMSA representativo, en la que se observa la sonda libre marcada (calle 1), un ensayo de competición con un exceso de sonda fría -no marcada- (calle 2) y el efecto de la administración de GCDCA (calles 3 y 4). El EMSA se desarrolló en un gel de poliacrilamida al 6% no desnaturizante. (C) Análisis densitométrico del EMSA. Los parámetros se determinaron 12h tras la administración de GCDCA. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (n=3). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a").



Además de los TFBS identificados de manera unánime para Sp1, AP-1 y GATA-1 mediante los tres programas de predicción, el análisis realizado con el software TESS identificó un sitio de unión teórico para MAZ (*Myc-associated zinc finger protein*) en la posición -73 del pNOS-3 (secuencia: CCCTCCC). En la Fig.67 se muestra cómo la administración de GCDCA se relacionó con una menor unión de MAZ a la sonda de ADN conteniendo el sitio de unión localizado en la posición -73 del pNOS-3 (Fig.67A y 67B). Sin embargo, estas diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística en el análisis de CHIP (Fig.67C).

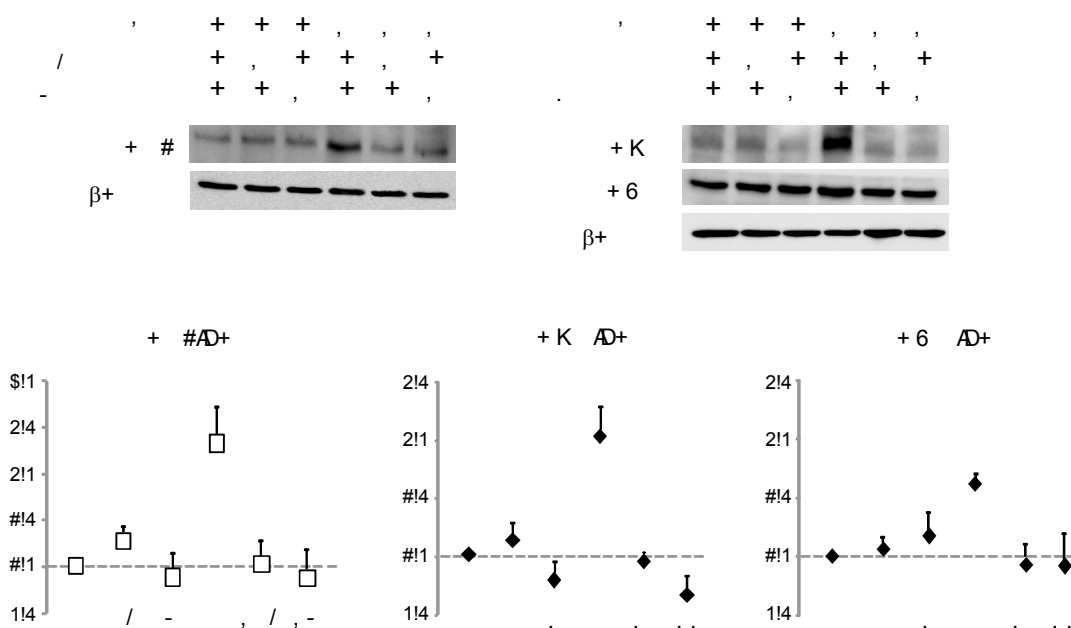
**Fig.67. Unión de MAZ a la posición -73 del pNOS-3.** (A) EMSA representativo para valorar la unión del FT al pNOS-3 en la posición -73. Migración de la sonda libre (calle 1) y del complejo entre el oligonucleótido marcado y MAZ (calles 2 y 3), en un gel de poliacrilamida al 6% no desnaturizante (n=3). (B) Análisis densitométrico del EMSA (C) Unión valorada por CHIP. Parámetros determinados 12h tras la administración de GCDCA. Resultados expresados como la media  $\pm$  error estándar (n=3). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a").



### 3.6 Sp1 y AP-1 regulan la expresión de NOS-3 durante la citotoxicidad por GCDCA

Tras analizar la capacidad de unión de los FTs Sp1 y AP-1 al pNOS-3 durante la citotoxicidad inducida por GCDCA en hepatocitos, el siguiente paso fue inhibir la actividad de los mismos para corroborar su participación en la regulación de la expresión de NOS-3 en nuestras condiciones experimentales. Como inhibidores específicos de Sp1 se emplearon el AT y la MitA, y como inhibidores de AP-1 se utilizaron la curcumina y la quercetina. Previamente, comprobamos el efecto de los inhibidores sobre el estado de fosforilación de los FTs. La Fig.68 muestra cómo la administración de los inhibidores disminuyó significativamente la activación de sus FTs diana, inducida tras la administración de GCDCA.

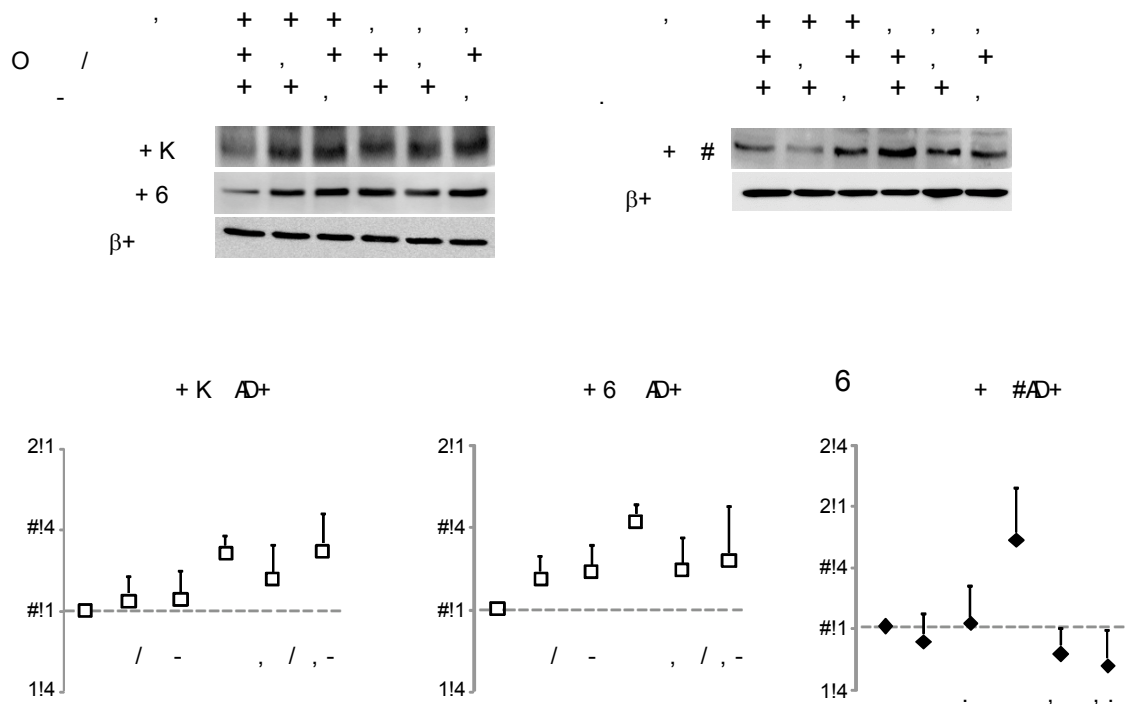
**Fig.68. Inhibición de SP1, cJun y cFos.** La activación de SP1 y cJun/cFos mediada por GCDCA fue inhibida por ácido tolfenámico (AT) o mitramicina A (M) y curcumina (Cu) o quercetina (Q), respectivamente. (A) Western-blot representativo. (B) Análisis densitométrico de los blots incluidos. "+": GCDCA (G) más el tratamiento indicado. El estudio se realizó 6h tras la (co)administración del tratamiento correspondiente. Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=3), así como las diferencias significativas estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) frente a los grupos control (C) ("a") o GCDCA ("b").



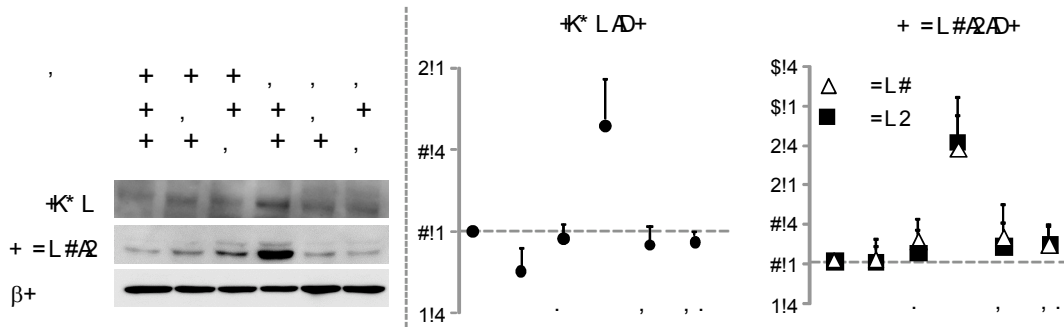


No obstante, mientras que el AT y la MitA no modificaron el estado de fosforilación de cJun o cFos tras la administración de GCDCA, la administración de curcumina y quercetina inhibió de forma significativa la activación de Sp1 (Fig.69). Por otra parte, cuando analizamos el estado de activación de JNK y ERK1/2, observamos como la administración de los inhibidores de AP-1 y Sp1, curcumina y quercetina, se relacionó con una menor fosforilación de las quinasas durante la citotoxicidad ejercida por la sal biliar (Fig.70).

**Fig.69. Especificidad de los inhibidores sobre sus factores de transcripción diana.** Mientras que la fosforilación de cJun/cFos inducida por GCDCA no se modificó por ácido tolfenámico (AT) o mitramicina A (M), el uso de curcumina (Cu) o quercetina (Q) sí inhibió la fosforilación de SP1. (A) Western-blot representativo. (B) Análisis densitométrico de los blots (n=3). "+": GCDCA (G) más el tratamiento indicado. El estudio se realizó 6h tras la (co)administración del tratamiento correspondiente. Se representa la media  $\pm$  error estándar y las diferencias significativas estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) frente a los grupos control (C) ("a") o GCDCA ("b").



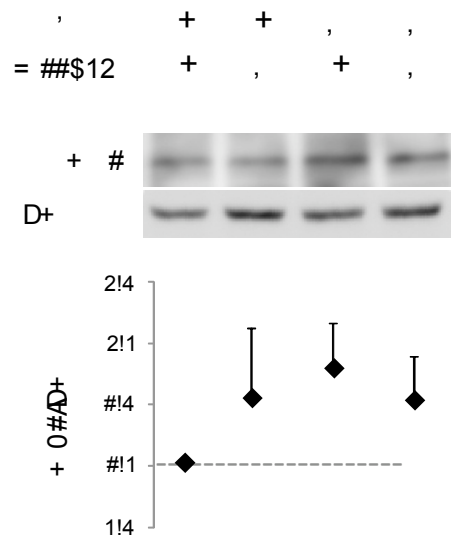
**Fig.70. Inhibición de la fosforilación de las MAPKs durante la citotoxicidad inducida por GCDCA.** Curcumina (Cu) y quercetina (Q) inhiben la fosforilación de JNK y ERK1/2 inducida por GCDCA. (A) Western-blot representativo. (B) Análisis densitométrico de los blots incluidos en (A). “+”: GCDCA más el tratamiento correspondiente. Los parámetros se determinaron 6h tras la adición de GCDCA (G). Los inhibidores se coadministraron con GCDCA. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (n=3). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control (C) (“a”) o frente al grupo GCDCA (“b”).



Debido a que curcumina y quercetina afectan al estado de fosforilación de Sp1 y, por tanto, no pueden ser considerados inhibidores específicos de AP-1, buscamos otro inhibidor para confirmar la participación del FT en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la citotoxicidad inducida por GCDCA. Como muestra la Fig.71, el retinoide sintético SR 11302, un conocido inhibidor específico de AP-1 [5], no modificó el estado de fosforilación de SP1.

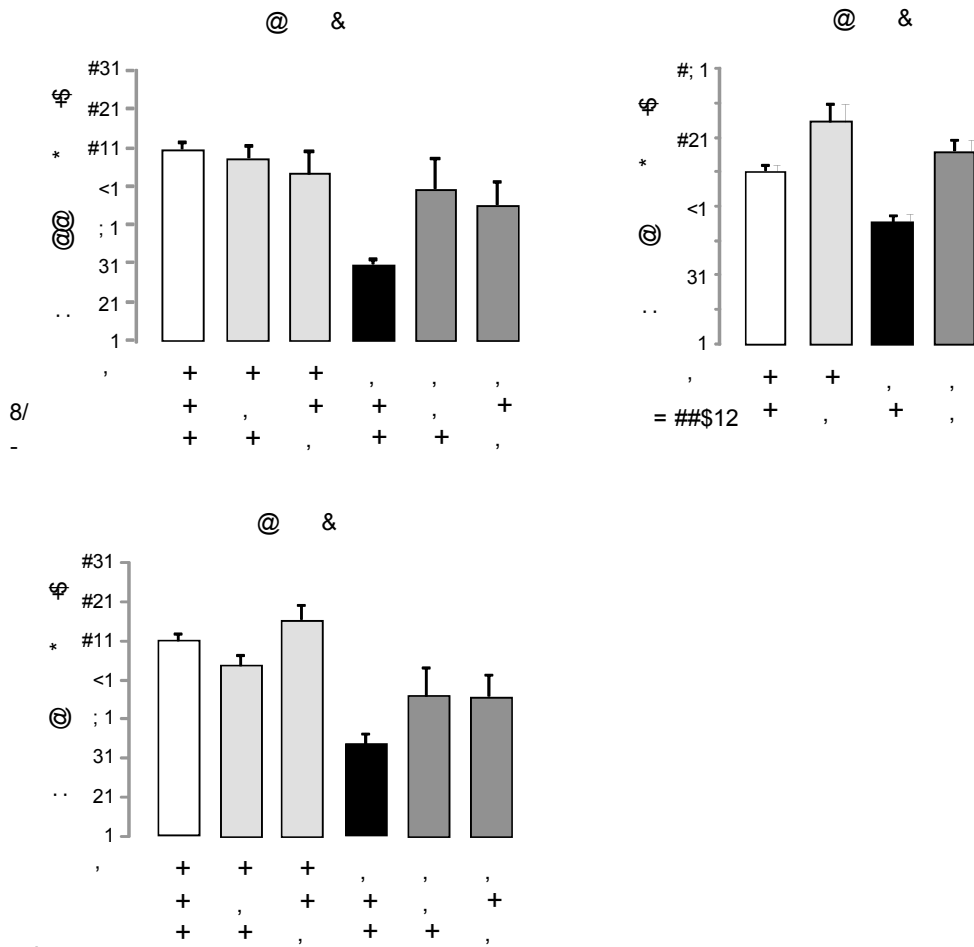
**Fig.71. Inhibición de Sp1 por SR 11302 durante la citotoxicidad por sales biliares.**

Western blot representativo para p-Sp1 (Thr453) en los lisados celulares de HepG2. Análisis densitométrico de las membranas (n=7). Los parámetros se determinaron 24h tras la administración de GCDCA. SR 11302 se coadministró con GCDCA. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. “a” indica diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control.



Una vez establecida la especificidad de los inhibidores sobre sus FTs diana, a continuación determinamos el efecto de la inhibición de Sp1 y/ó AP-1 sobre la actividad del pNOS-3 en las células pGL4-NOS3. Como muestra la Fig.72, la inhibición de Sp1 se relacionó con la restauración de la actividad transcripcional del pNOS-3 durante la citotoxicidad ejercida por GCDCA (Fig.72A). Del mismo modo, la inhibición específica de AP-1 (Fig.72B) restableció la actividad del pNOS-3 en presencia de la sal biliar.

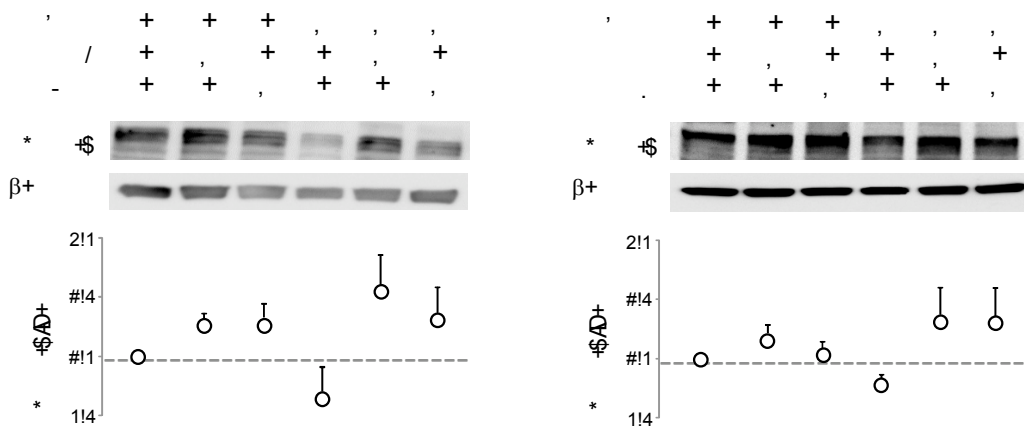
**Fig.72. Sp1 y AP-1 regulan la actividad del pNOS-3 durante la citotoxicidad por GCDCA.** Actividad del pNOS-3 en las células pGL4-NOS3 en presencia de (A) los inhibidores de Sp1 (n=3), (B) el inhibidor específico de AP-1 (n=3) y (C) los inhibidores de AP-1/Sp1 (n=6). La actividad luciferasa se determinó 6h tras la adición de GCDCA. Los inhibidores se coadministraron con GCDCA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o frente al grupo GCDCA ("b").



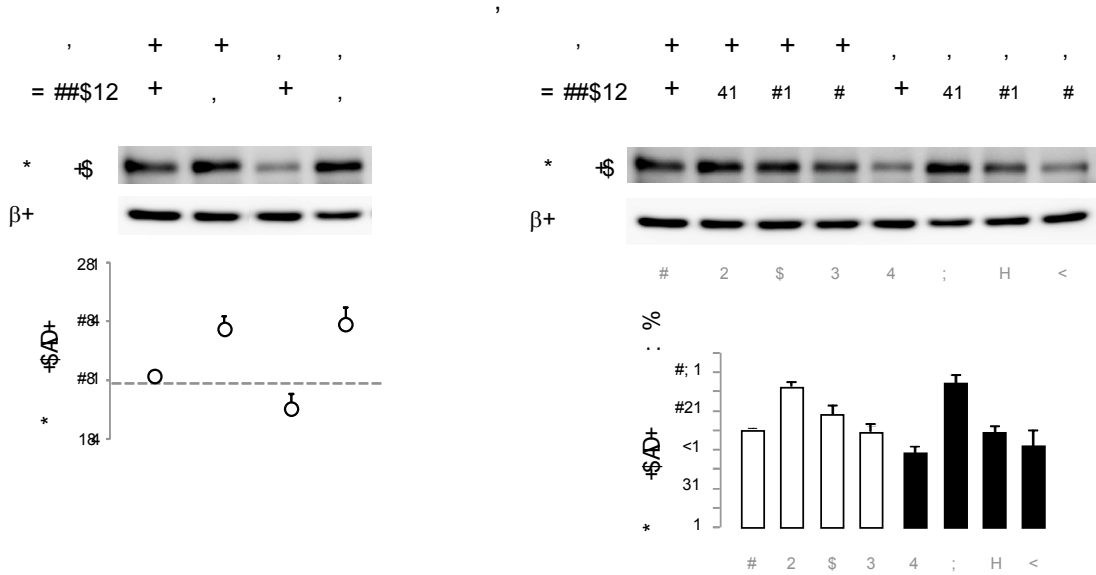
Cabe destacar que la inhibición combinada de ambos FTs mediante curcumina y quercetina no tuvo un efecto sinérgico sobre la actividad del promotor durante la citotoxicidad ejercida por GCDCA (Fig.72C).

De manera consecuente al efecto observado sobre la actividad del promotor, la inhibición de los FTs recuperó la expresión de la proteína NOS-3 en las células HepG2 tratadas con GCDCA (Fig.73A-73C). Además, el mayor incremento de expresión de NOS-3 (148%) se observó cuando se utilizó la mayor concentración del inhibidor de AP-1, SR 11302 (50  $\mu$ M) (Fig.73D). Este efecto de restauración de la expresión de NOS-3 coincidió con la acumulación extracelular de los productos finales de la oxidación del ON (Fig.74).

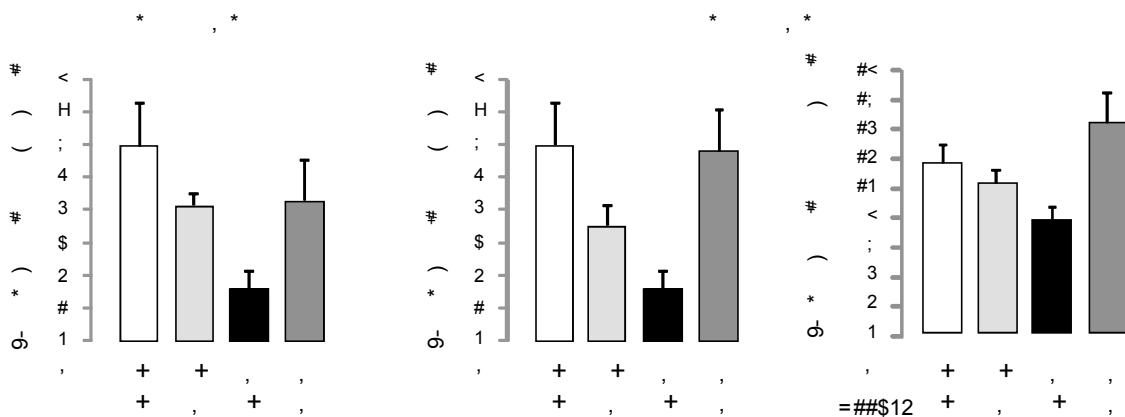
**Fig.73A-B. Sp1 y AP-1 regulan la expresión de NOS-3 durante la colestasis** . Western-blots representativos de la expresión de NOS-3 en presencia de (A) los inhibidores de Sp1, ácido tolfenámico (AT) y mitramicina A (MitA), y (B) los inhibidores de AP-1/Sp1, curcumina (Cu) y quercetina (Q). Se muestra el análisis densitométrico de las membranas incluidas en cada estudio (n=3). La expresión de NOS-3 se determinó 6h tras la administración de GCDCA. Los inhibidores se coadministraron con GCDCA. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o frente al grupo GCDCA ("b").



**Fig.73C-D. Sp1 y AP-1 regulan la expresión de NOS-3 durante la colestasis** . (C) Western-blot representativo de la expresión de NOS-3 en presencia de SR 11302 (50µM). Análisis densitométrico de las membranas incluidas en cada estudio (n=3). (D) Recuperación dosis-dependiente de la expresión de NOS-3 por SR 11302 (50, 10 y 1µM), durante la citotoxicidad por GCDCA. Los inhibidores se coadministraron con GCDCA y la expresión de NOS-3 se determinó 6h después. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o GCDCA ("b").



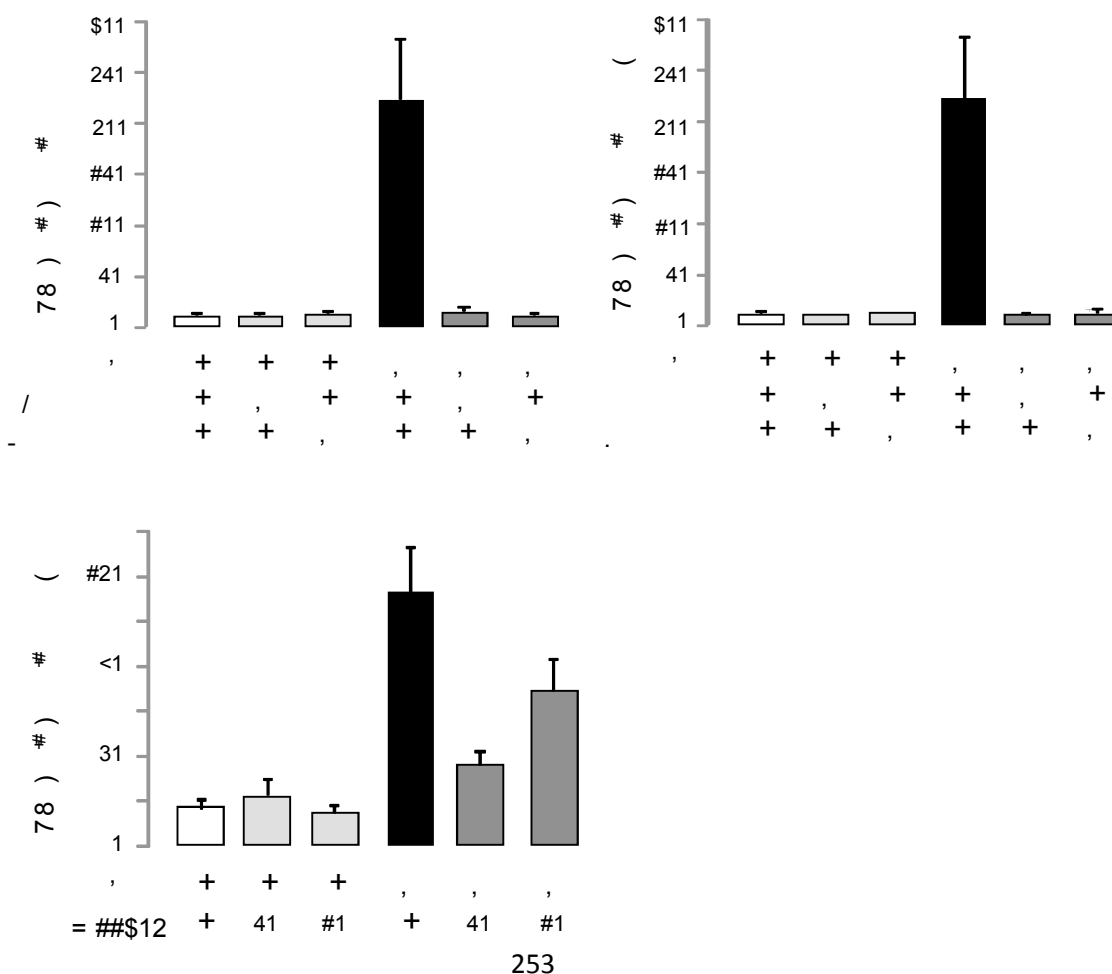
**Fig.74. Sp1 y AP-1 regulan la producción de ON durante la colestasis** . Efecto de la inhibición de Sp1 y de AP-1 sobre la acumulación de los productos finales del ON en el medio extracelular, durante la citotoxicidad por GCDCA (n=3). Los parámetros se determinaron 24h tras la administración de GCDCA. Los inhibidores se coadministraron con GCDCA. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o frente al grupo GCDCA ("b").



### 3.7 La inhibición de AP-1 y SP1 protege frente a la muerte celular inducida por GCDCA

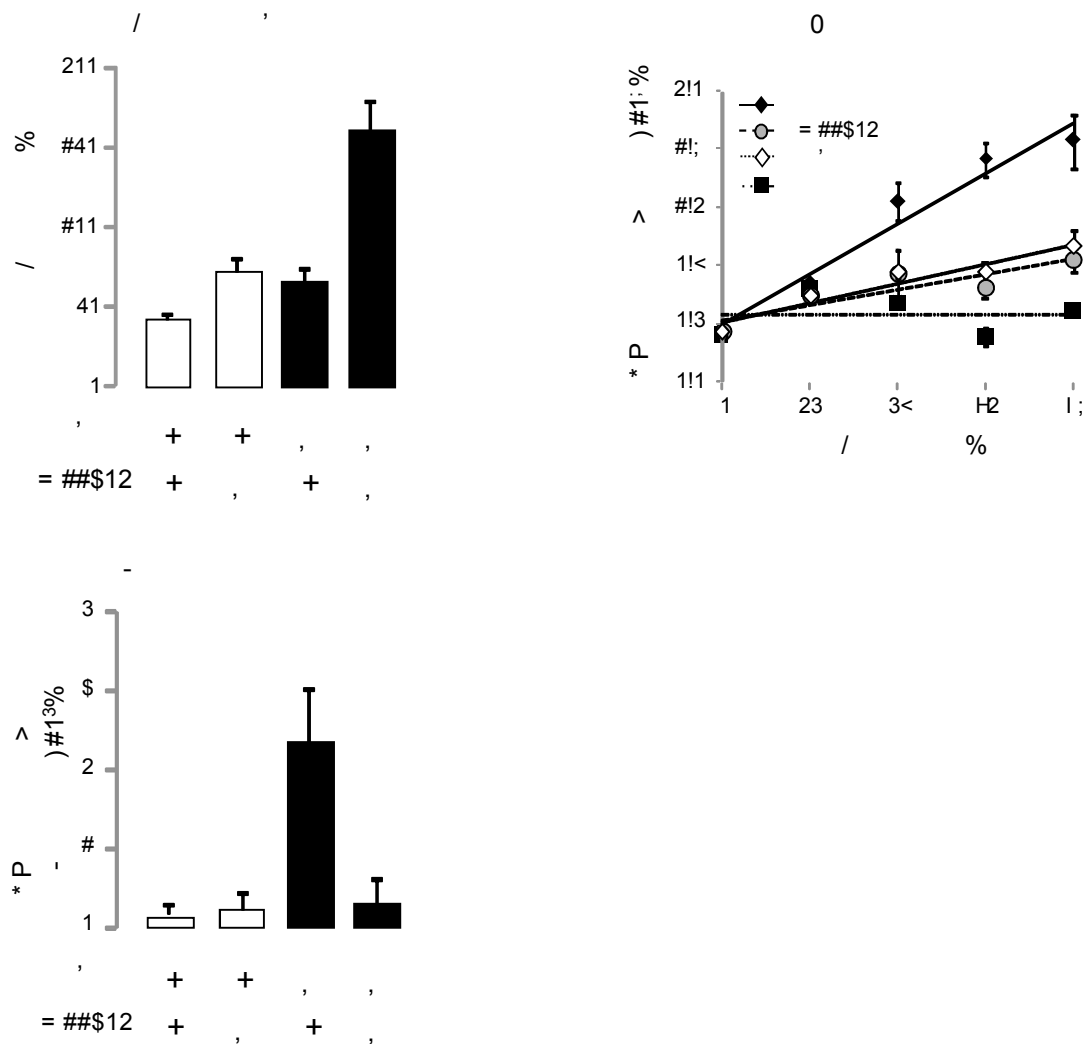
La restauración de la actividad del pNOS-3 y el consecuente incremento en la síntesis de la proteína NOS-3 y la producción de ON, logrados tras la inhibición de Sp1 y/o AP-1 durante la colestasis experimental, se vieron acompañados por un descenso de la actividad caspasa-3 (Fig.75A y 75B). En el caso del retinoide SR 11302, este descenso fue dosis-dependiente (Fig.75C).

**Fig.75. La inhibición de Sp1 y AP-1 protege frente a la citotoxicidad por GCDCA.** Se muestra el efecto de (A) la inhibición específica de Sp1, (B) de la inhibición conjunta de AP-1/Sp1, y (C) de la inhibición específica de AP-1, sobre la muerte celular inducida por GCDCA. Los inhibidores se coadministraron con GCDCA 24h antes de la medida de la actividad caspasa-3. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (n=4). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o frente al grupo GCDCA ("b").



A continuación, considerando la capacidad antitumoral del SR 11302, analizamos cómo afecta la inhibición específica de AP-1 a la proliferación celular. Como se observa en la Fig.76A, la administración del retinoide tuvo un efecto similar al observado para GCDCA sobre el tiempo de duplicación celular a las 96h de tratamiento (TD<sub>96h</sub>) (Fig.76A). Además, la coadministración de SR 11302 con GCDCA duplicó el TD<sub>96h</sub> registrado durante la administración individual del inhibidor o de la sal biliar (Fig.76A y 76B).

**Fig.76. Papel de AP-1 en la supervivencia celular durante la citotoxicidad por GCDCA.** (A) Efecto de la inhibición de AP-1 sobre el tiempo de duplicación celular, la capacidad de proliferación celular (B) y la acumulación de células muertas (C) tras 96h de la coadministración de GCDCA y SR 11302. Resultados expresados como media ± error estándar (n=3). Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a") o GCDCA ("b").



Sin embargo, aunque la inhibición específica de AP-1 se asoció a una menor velocidad de crecimiento celular, es decir, a un mayor tiempo de duplicación (Fig.76A y 76B), esto fue independiente de la actividad caspasa-3 (Fig.75C). De hecho, la administración de SR 11302 redujo de manera significativa el número de células muertas acumuladas tras la administración de GCDCA (Fig.76C).

### **3.8 SR 11302 protege durante la colestasis experimental a través de la recuperación de la expresión de NOS-3**

Con el objetivo de investigar el papel que juega NOS-3 durante la protección celular por SR 11302 en nuestro modelo de colestasis *in vitro*, determinamos la capacidad antiapoptótica del retinoide en presencia del inhibidor de la actividad NOS L-NAME.

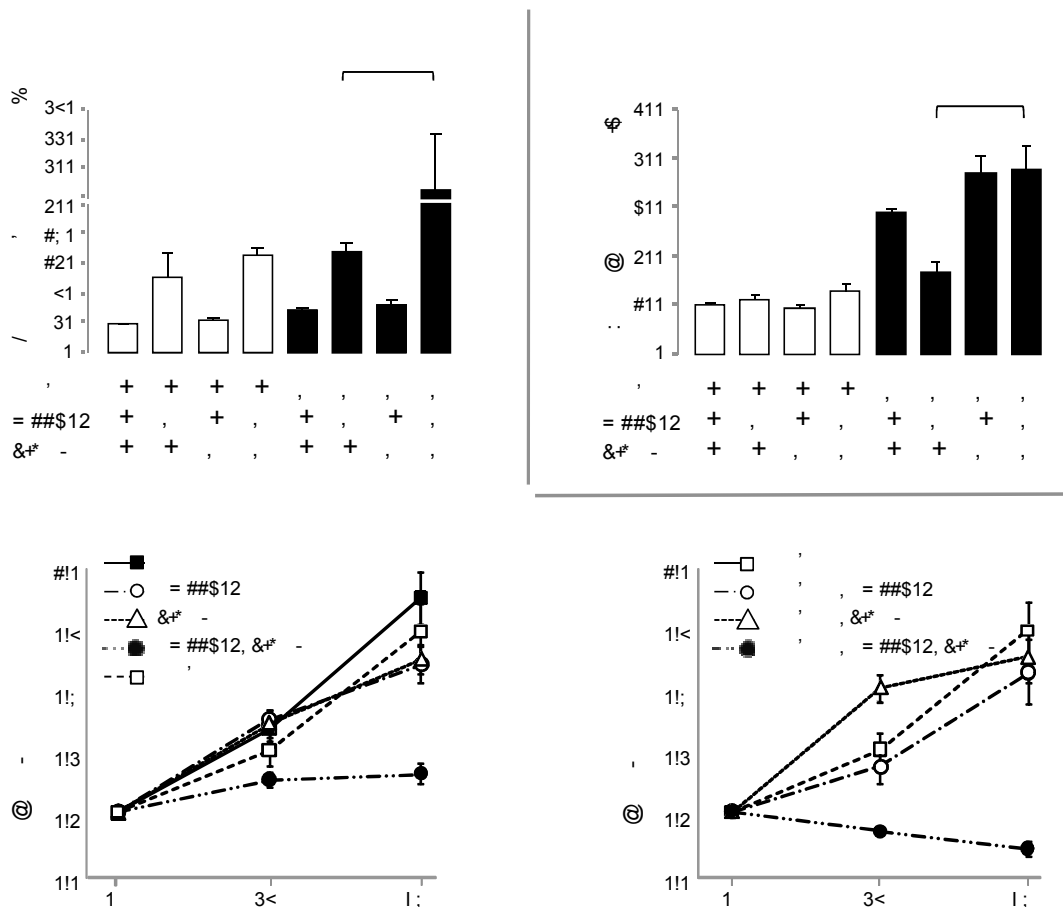
En combinación con L-NAME, el inhibidor específico de AP-1 falló en demostrar las propiedades citoprotectoras observadas con anterioridad durante el tratamiento con GCDCA. Así, mientras que la administración de L-NAME no tuvo repercusión sobre la proliferación celular (Fig.77A y 77B) y la muerte celular (Fig.77C) en condiciones basales, la inhibición de la actividad NOS bloqueó el efecto antiapoptótico de SR 11302 en las células tratadas con GCDCA (Fig.77C), incrementándose el tiempo de duplicación celular (Fig.77A). El análisis de la actividad metabólica celular arrojó un resultado similar (Fig.77B).

Al indagar en la capacidad antiproliferativa de SR 11302, observamos que la administración del retinoide en condiciones basales se asociaba con la inhibición de la expresión de ciclina D1, una importante proteína involucrada en la progresión del ciclo celular (Fig.78). Este resultado se ajustaba a las observaciones descritas anteriormente. No obstante, de manera opuesta a lo esperado, la expresión de esta misma ciclina fue inducida en presencia de GCDCA. En este sentido, la adición de GCDCA (al igual que SR 11302) había

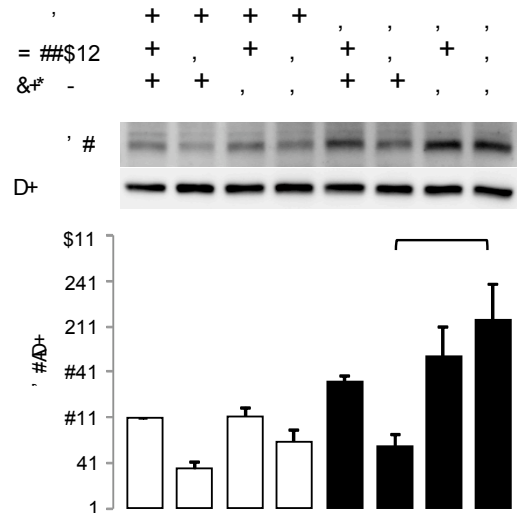


sido asociada con la reducción de la proliferación celular. En estas circunstancias, la inhibición específica de AP-1 por SR 11302 suprimió el efecto de la sal biliar sobre la ciclina. Del mismo modo, el bloqueo de la actividad NOS por L-NAME inhibió de nuevo el efecto del retinoide, recuperándose así la sobreexpresión de la ciclina D1 durante la citotoxicidad por GCDCA (Fig.78).

**Fig.77. La actividad NOS se relaciona con la capacidad citoprotectora de SR 11302 durante la colestasis**. Efecto de la inhibición de la actividad NOS sobre (A) el tiempo de duplicación (n=6), (B) la actividad metabólica (n=8) y (C) la actividad caspasa-3 (n=3); (A) y (C) fueron determinadas 96h y 24h tras la administración de GCDCA, respectivamente; (B) se determinó a las 0, 24, 48, 72 y 96h de la administración de GCDCA. SR 11302 y L-NAME se coadministraron con GCDCA. En (A) solo se han considerado los datos positivos para los grupos 'GCDCA+SR 11302' (n=4) y 'GCDCA+SR 11302+L-NAME' (n=3). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a"), frente al grupo GCDCA ("b"), o entre los grupos 'GCDCA+SR 11302' y 'GCDCA+SR 11302+L-NAME' ("S").



**Fig.78. SR 11302 bloquea la sobreexpresión de ciclina D1 inducida por GCDCA de manera dependiente a la actividad NOS.** Efecto de la inhibición de la actividad NOS sobre la expresión de la ciclina D1. Western blot representativo para ciclina D1 y el análisis densitométrico de las membranas (n=4). La expresión se cuantificó a 24h tras la administración de GCDCA. SR 11302 y L-NAME se coadministraron con GCDCA. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al grupo control ("a"), frente al grupo GCDCA ("b"), o entre los grupos 'GCDCA+SR 11302' y 'GCDCA+SR 11302+L-NAME' ("S").



## 4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NOS-3 DURANTE LA COLESTASIS EXPERIMENTAL ( )#

\* ( \* - #

### 4.1. El modelo de colestasis !"# \$!\$' reproduce las observaciones realizadas en la línea celular HepG2

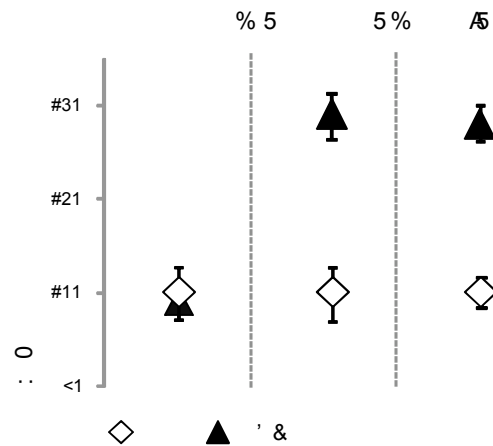
El grupo de animales sometidos a la ligadura del conducto biliar desarrolló ictericia como consecuencia de un aumento significativo de los niveles circulantes en suero de bilirrubina total y directa. Del mismo modo, la obstrucción biliar se relacionó con un aumento significativo de los marcadores bioquímicos de daño hepático GGT, AST y ALT, respecto al grupo de animales con operación simulada (Tabla 20).

**Tabla 20. Marcadores séricos de función hepática y de colestasis en ratas sometidas a obstrucción biliar.** Concentración en suero de  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina total (BT) y bilirrubina directa (BD). OS, grupo con operación simulada (n=13); BDL, grupo sometido a ligadura del conducto biliar (n=13). Los datos se representaron como la media  $\pm$  error estándar ( $p \leq 0.05$ ). (a) diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo OS.

	GGT (UI/l)	AST (UI/l)	ALT (UI/l)	BT (UI/l)	BD (UI/l)
<b>OS</b>	4 $\pm$ 0	62,92 $\pm$ 2,74	44 $\pm$ 6,65	0,13 $\pm$ 0,013	0,1 $\pm$ 0
<b>BDL</b>	52,38 $\pm$ 6,90 <sup>a</sup>	332,54 $\pm$ 45,71 <sup>a</sup>	130,22 $\pm$ 17,85 <sup>a</sup>	9,13 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	7,03 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>

Previo al sacrificio, todos los animales fueron pesados, no observándose diferencias de peso corporal entre los grupos. Sin embargo, el grupo de animales BDL presentó un aumento significativo en el peso del hígado y en la relación peso del hígado/peso corporal (Fig.79).

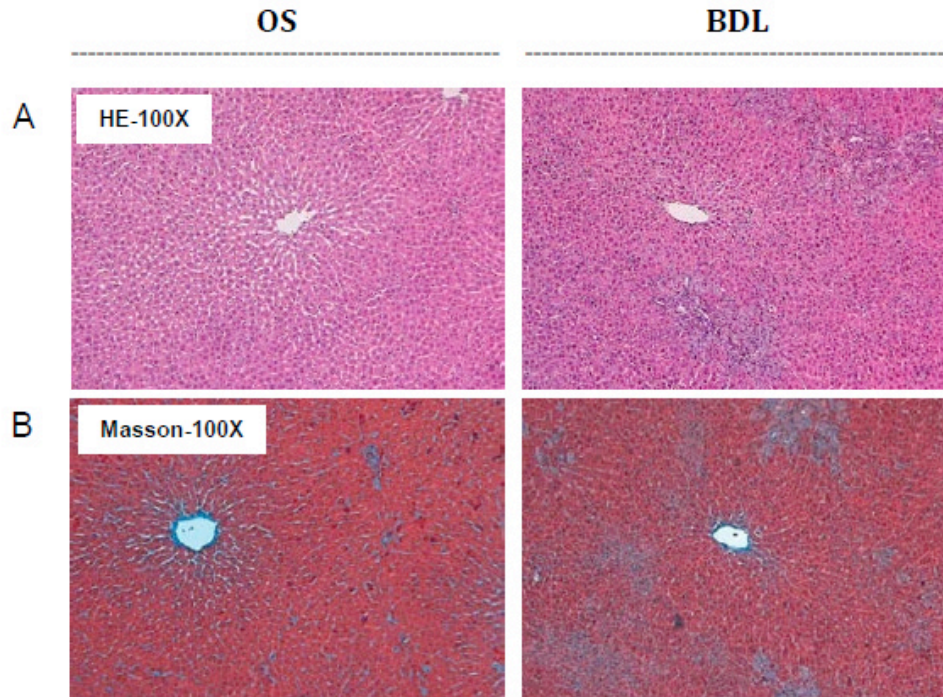
**Fig.79. Variación del peso corporal y hepático tras la ligadura del conducto biliar.** OS, grupo de animales con operación simulada (n=13); BDL, grupo de animales sometidos a ligadura del conducto biliar (n=13). Los datos se representaron como la media  $\pm$  error estándar ( $p \leq 0.05$ ). (a) diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo OS.



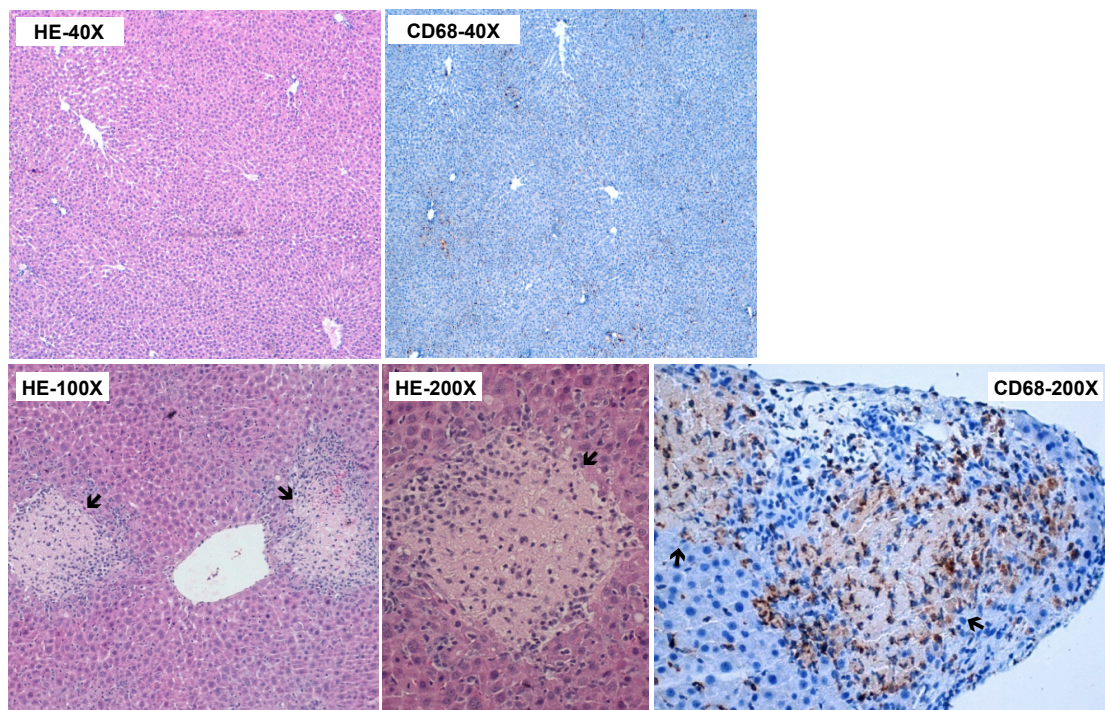
El daño hepático se valoró mediante técnicas histológicas. La tinción con hematoxilina-eosina no reveló daño morfológico en el grupo OS. Por el contrario, el grupo BDL mostró una pérdida de la estructura hepática y una marcada proliferación de los ductos biliares próximos a las áreas portales (Fig.80A). Además, en este grupo de animales se observó una mayor acumulación de fibras de colágeno en el parénquima hepático (Fig. 80B).

Para identificar un posible infiltrado de células inflamatorias, previamente analizamos mediante tinción con hematoxilina-eosina la presencia de focos de invasión de macrófagos. Una vez confirmada su existencia, valoramos la expresión de CD68 por inmunohistoquímica. El análisis reveló un único caso inmunoreactivo al anticuerpo anti-CD68 en el grupo de animales OS, frente a los diez casos identificados en el grupo BDL. En la Fig.81 se muestran las áreas de invasión de macrófagos identificadas mediante la tinción de hematoxilina-eosina en el grupo de animales BDL coincidiendo con la presencia de células CD68<sup>+</sup>.

**Fig.80. Análisis histológico.** Imágenes representativas de la evaluación de (A) daño hepático y (B) fibrosis hepática mediante la tinción de hematoxilina-eosina y el Tricrómico de Masson (azul, fibrosis), respectivamente (n=3). OS, operación simulada (n=13); BDL, ligadura del conducto biliar (n=13). Magnificación: 100X.



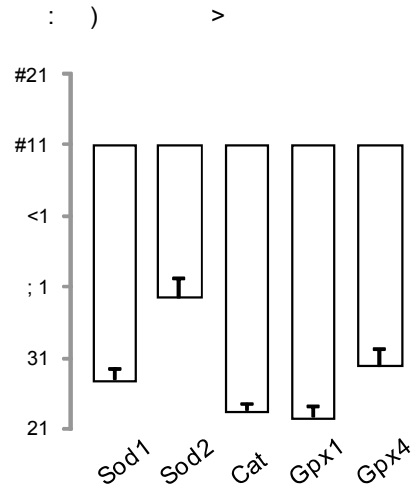
**Fig.81. Análisis inmunohistoquímico.** Imágenes representativas de la evaluación de la presencia de macrófagos mediante hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica (CD68<sup>+</sup>). Las flechas indican focos de invasión de macrófagos. OS, operación simulada (n=13, 1 caso positivo); BDL, ligadura del conducto biliar (n=13, 10 casos positivos).



Del mismo modo que en el modelo *in vitro*, la obstrucción biliar se relacionó con una disminución de la expresión de los genes antioxidantes Sod1, Sod2, catalasa, Gpx1 y Gpx4 (Fig.82).

**Fig.82. La obstrucción biliar altera el sistema antioxidante celular.**

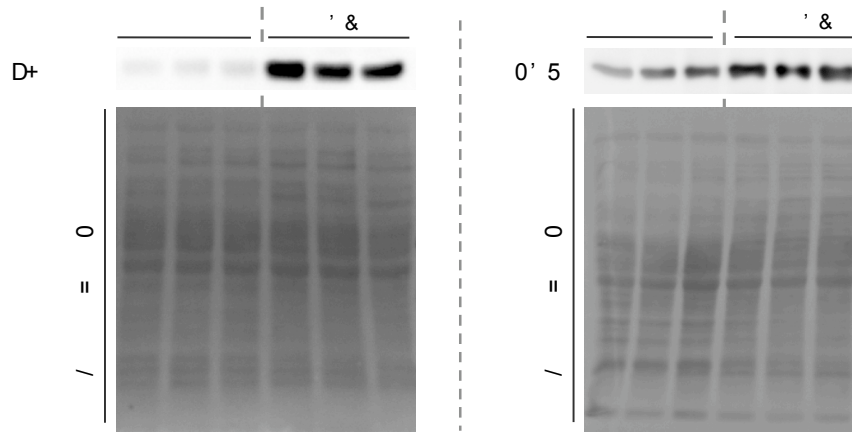
Cuantificación de la expresión génica por qRT-PCR de los genes Sod1, Sod2, catalasa, Gpx1 y Gpx4. OS, grupo con operación simulada (n=13); BDL, grupo sometido a ligadura del conducto biliar (n=13). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar en %. (a) diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al grupo OS.



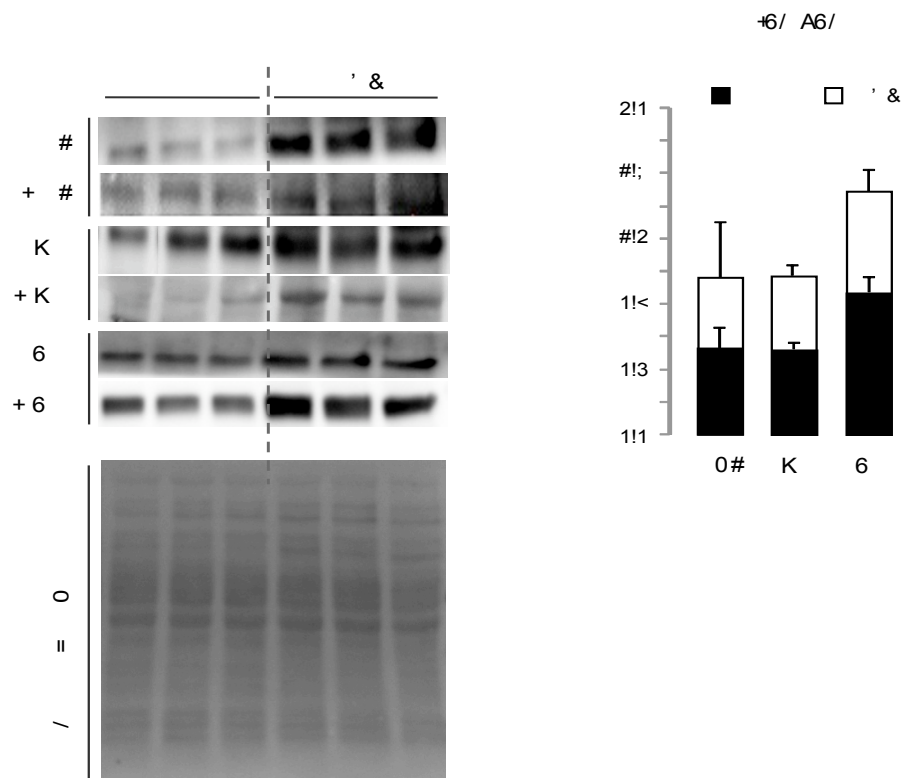
A continuación, procedimos a valorar el efecto de la colestasis extrahepática sobre la expresión y activación de los FTs previamente analizados en el modelo *in vitro*. Previamente, y debido al hecho de que la ligadura del conducto biliar se ha relacionado con el desarrollo de fibrosis (Lopez-Sanchez et al., 2010) a través de la inducción de la expresión de proteínas habitualmente utilizadas como control de carga en el análisis mediante western blot (Boujedidi et al., 2012; Congiu et al., 2011), examinamos la expresión de las proteínas  $\beta$ -actina y GAPDH en los dos grupos establecidos. Como muestra la Fig.83, la obstrucción biliar indujo la expresión de dichas proteínas en el lisado hepático de rata. Por ello, decidimos emplear la tinción rojo Ponceau como control de carga para determinar la relación ‘proteína fosforilada/no fosforilada’ durante el análisis de expresión de los FTs.

Al igual que en modelo *in vitro*, la colestasis extrahepática se relacionó con una mayor expresión y fosforilación de Sp1, cJun y cFos en el grupo BDL (Fig.84A). Además, el análisis densitométrico mostró un valor más elevado para la relación entre la forma fosforilada/no fosforilada de los tres FTs durante la obstrucción biliar (Fig.84B).

**Fig.83. La obstrucción biliar induce la expresión de  $\beta$ -actina y GAPDH.** Western blot y tinción rojo Ponceau representativos para valorar la expresión de (A)  $\beta$ -actina y (B) GAPDH, en el lisado de tejido hepático. OS, grupo con operación simulada (n=13); BDL, grupo sometido a ligadura del conducto biliar (n=13).

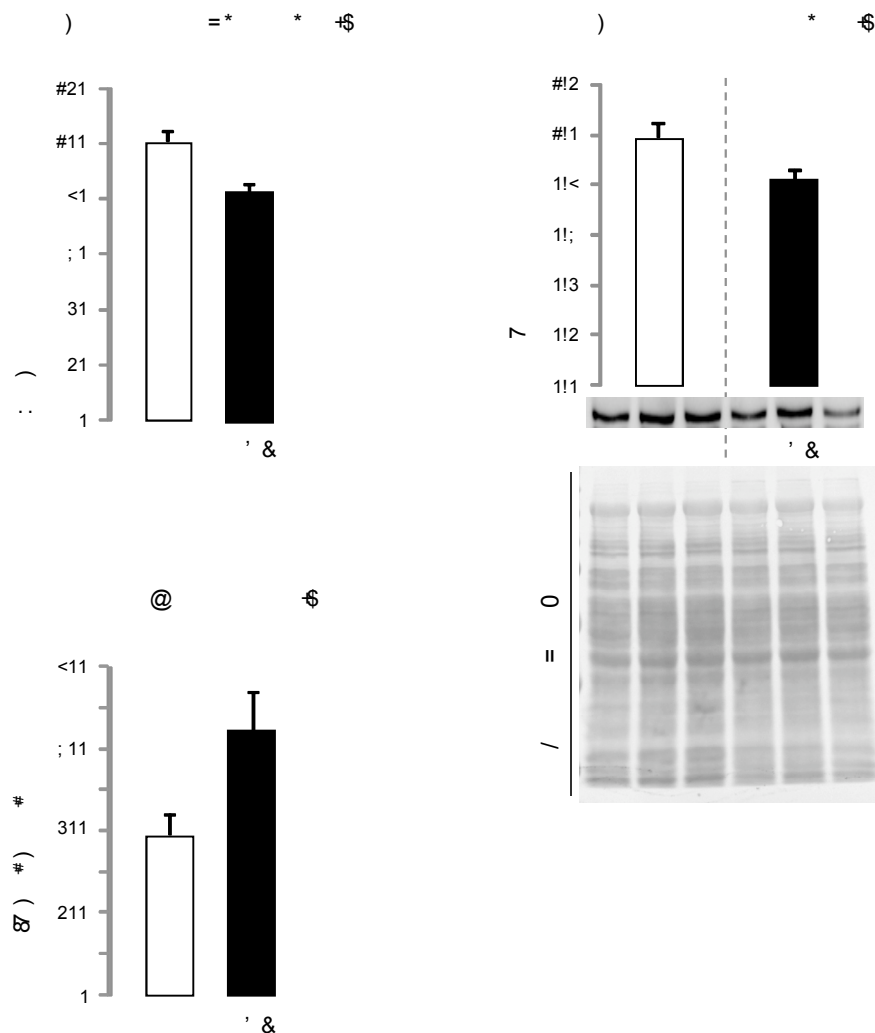


**Fig.84. La obstrucción biliar induce la expresión y activación de Sp1, cJun y cFos.** (A) Western blot y tinción rojo Ponceau representativos para (p-)Sp1, (p-)cJun y (p-)cFos en el lisado hepático. (B) Análisis densitométrico de los blots incluidos en (A). Se muestra la relación p-FT/FT. OS, grupo con operación simulada (n=13); BDL, grupo con obstrucción biliar (n=13). Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar. (a) diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al grupo OS.



De nuevo, la obstrucción biliar se asoció con la inhibición de la expresión de NOS-3 a nivel transcripcional y proteico (Fig.85A y 85B), a imagen de lo observado en el modelo *in vitro*. Además, este hecho volvió a relacionarse con un aumento significativo de la actividad caspasa-3 (Fig.85C) en el tejido hepático del grupo BDL.

**Fig.85. Expresión de NOS-3 y su relación con la muerte celular durante la obstrucción biliar.** La expresión de NOS-3 en el lisado hepático de los animales incluidos en el grupo OS (operación simulada, n=13) y BDL (ligadura del conducto biliar, n=13) fue cuantificada (A) a nivel de transcrito, mediante qRT-PCR, y (B) a nivel de proteína, mediante western-blot (se incluye imagen y tinción rojo Ponceau representativos, y el análisis densitométrico), refiriendo la expresión a la cantidad de proteína cargada en la electroforesis. (C) Actividad caspasa-3 en el lisado hepático. Resultados expresados como la media  $\pm$  error estándar. (a) diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al grupo OS.







## **VI. DISCUSIÓN**



Los mecanismos por los que los ácidos biliares producen daño hepático no se conocen con exactitud. Estudios previos han atribuido el efecto citotóxico de las sales biliares a su capacidad detergente y grado de hidrofobicidad. No obstante, aunque los ácidos biliares se acumulan en el hígado durante la colestasis, no lo hacen hasta alcanzar concentraciones tales como para desarrollar su acción detergente y solubilizar las membranas celulares (Attili et al., 1986). Existen, además, numerosas pruebas experimentales que demuestran que el desarrollo de la enfermedad hepática colestásica se relaciona con diversos mecanismos celulares íntimamente relacionados, incluyendo la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la muerte celular (Rodrigues et al., 1998b) (Rodrigues et al., 1998a). De hecho, diversos estudios sugieren que los radicales libres desempeñan un papel clave durante el daño colestásico, estando su producción estimulada por la presencia de los ácidos biliares hidrofóbicos (Dahm et al., 1988). A nivel clínico, la generación de radicales libres durante la colestasis resulta evidente, observándose un incremento de los niveles de peróxidos en plasma y eritrocitos de niños con colestasis crónica (Lemonnier et al., 1987; Lubrano et al., 1989). Además, la restauración del sistema antioxidante en pacientes colestásicos se relaciona con una disminución de la concentración sérica de ácidos biliares hidrofóbicos y la reducción del daño hepático (Sokol et al., 1986).

En nuestro modelo celular de colestasis, la adición de GCDCA se relacionó con el daño hepatocelular a través de la activación de las dos vías de muerte celular, apoptosis y necrosis. Aunque ambos se consideran fenómenos independientes, coexisten frecuentemente durante las enfermedades hepáticas en un único proceso denominado necroapoptosis. En este, la liberación de citocromo c causa la disfunción mitocondrial, caracterizada por la despolarización de la membrana y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Así, el mismo mecanismo que promueve la apoptosis a través de la liberación

de citocromo c, puede causar simultáneamente muerte celular por necrosis dependiente de la reducción de ATP [13, 14].

El efecto citotóxico promovido por la sal biliar estuvo acompañado por la alteración del sistema redox celular, comprometiendo la defensa antioxidante al disminuir la expresión de los genes SOD1, SOD2 y CAT. Este fenómeno coincidió con una mayor producción celular de EROs, cuantificado a través de las sondas DHE, H<sub>2</sub>DCFDA y ADHP. Debido a que dichas sondas pueden ser oxidadas por EROs de distinta naturaleza, su uso se considera acertado para cuantificar el estrés oxidativo celular de manera inespecífica (Wojtala et al., 2014). De este modo, en presencia de catalasa, la oxidación de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA se redujo a la mitad, tanto en condiciones basales como durante la citotoxicidad por GCDCA, indicando que otras EROs aparte del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deben estar contribuyendo a su oxidación. El análisis de la CTE mitocondrial como principal fuente de estrés oxidativo celular, confirmó que la adición de GCDCA se asocia con una reducción de la actividad combinada de los complejos respiratorios CII+CIII, sin afectar a la actividad enzimática individual de los complejos CI, CII y CIV, ó combinada CI+CIII. Este resultado implica la existencia de un defecto en el flujo de electrones entre los complejos CII y CIII como consecuencia de la acumulación de la sal biliar, y no una disfunción de cualquiera de ellos por separado. En este sentido, Krähenbühl y cols. obtuvieron resultados similares tanto *in vivo*, en un modelo animal de ligadura del conducto biliar [15], como *in vitro*, a través de la adición de CDCA a mitocondrias aisladas de hígado de rata [18]. No obstante, la sensibilidad de la CTE frente al CDCA fue mayor que la registrada en el presente estudio mediante GCDCA (la forma del ácido biliar conjugada con glicina), debido en parte a la capacidad del CDCA para incorporarse en la membrana mitocondrial e inducir cambios en su composición lipídica, siendo necesaria para el correcto funcionamiento de la CTE. Nuestros resultados estarían de acuerdo con la existencia de reservorios de ubiquinona independientes para la transferencia de electrones entre

los complejos CI y CIII ó entre CII y CIII. De este modo, podríamos explicar el efecto que tiene la acumulación de GCDCA sobre la actividad combinada CII+CIII sin afectar a la actividad CI+CIII, ni a la de los complejos individuales CI y CII. En cualquier caso, tanto el incremento de la peroxidación lipídica (daño oxidante en las membranas celulares) como la deficiencia de acetil-CoA en el hígado (molécula implicada en la síntesis de ubiquinona) han sido relacionados con la disminución de la concentración de ubiquinona durante la colestasis (Krahenbuhl et al., 1995) . La relevancia de nuestros resultados para explicar la generación de estrés oxidativo en el modelo de colestasis *in vitro* con GCDCA queda de manifiesto al considerarse la fuga de electrones entre la ubiquinona y el CIII, la principal fuente de generación de  $O_2^{\bullet-}$  durante la toxicidad inducida por ácidos biliares [16]. De acuerdo con investigaciones previas de Kelso y cols. (Kelso et al., 2001), el tratamiento con MitoQ (un derivado de la ubiquinona que se acumula en la mitocondria) redujo eficazmente el estrés oxidativo celular provocado por la acumulación de GCDCA, al restablecer el flujo de electrones entre los complejos CII y CIII. Además, la reducción de estrés oxidativo mediante cualquiera de los antioxidantes, MitoQ, NAC o MnTBAP, se relacionó con la recuperación de la expresión génica de SOD-1, SOD-2 y CAT. Esto coincide con el hecho de que la actividad enzimática de las proteínas codificadas por estos genes puede ser inhibida por EROs. Así, mientras que la SOD puede ser inhibida por  $H_2O_2$ , la catalasa se inhibe en presencia de  $O_2^{\bullet-}$  (Blum and Fridovich, 1985; Hodgson and Fridovich, 1975). Por tanto, la generación de estrés oxidativo puede ir asociado a un círculo vicioso a través de la desregulación del sistema antioxidante celular, excediéndose la capacidad antioxidante del hígado y resultando de esta manera en un mayor daño oxidativo (Pastor et al., 1997). En este sentido, la obstrucción biliar en ratas ha sido asociada con una menor actividad del sistema antioxidante celular, favoreciéndose la presencia de EROs y el daño hepático (Pastor et al., 1997; Tiao et al., 2009).

Acorde con un modelo de citotoxicidad por estrés oxidativo, la recuperación del sistema antioxidante celular y la reducción de dicho estrés mediante el uso de los antioxidantes también causó un incremento de la supervivencia celular durante la toxicidad por GCDCA. Esto concuerda con trabajos previos donde el empleo de diferentes estrategias antioxidantes se relaciona con una reducción de la muerte celular en distintos modelos experimentales con hepatocitos (Gonzalez et al., 2011; Gonzalez et al., 2009). El uso terapéutico de los antioxidantes para el tratamiento de las enfermedades hepáticas, entre ellas la colestasis, es actualmente objeto de estudio. Por ejemplo, el tratamiento con NAC en ratas sometidas a BDL se relaciona con el restablecimiento de los parámetros asociados con la disminución del contenido de GSH y el estrés oxidativo celular (Galicia-Moreno et al., 2012; Pastor et al., 1997; Portincasa et al., 2007; Tahan et al., 2007), previniendo el daño celular (Colell et al., 1998). Asimismo, el empleo de MnTBAP y MitoQ en distintos modelos experimentales de enfermedad hepática protegen frente al estrés oxidativo restableciendo la función mitocondrial e inhibiendo la muerte hepatocelular (Garcia-Ruiz et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2014; Malassagne et al., 2001; Mukhopadhyay et al., 2012).

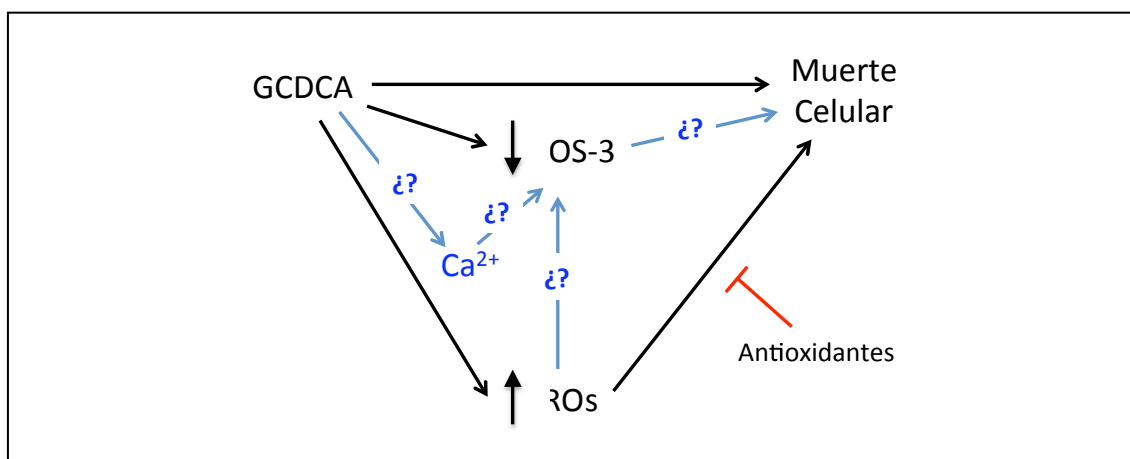
La inducción de muerte celular por GCDCA y la producción de estrés oxidativo son fenómenos que, además de estar relacionados entre sí, han sido asociados con la alteración de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Spivey et al., 1993) y su vía de señalización intracelular (Ermak and Davies, 2002; Nicotera and Orrenius, 1998). Por otro lado, el estrés oxidativo y el  $Ca^{2+}$  son factores relacionados con la actividad óxido nítrico sintasa celular. Así, el  $Ca^{2+}$ , entre otros, es un cofactor de la NOS-3 (única isoforma dependiente de  $Ca^{2+}$  expresada por los hepatocitos) cuya concentración intracelular es capaz de regular la expresión de genes de la familia NOS y la producción de ON (Alderton et al., 2001; Park et al., 1996). Por su parte, el estrés oxidativo también ha sido relacionado con la desregulación de la expresión de las distintas isoformas de la NOS

(incluida la NOS-3) y con la biodisponibilidad de ON (Chen et al., 2009; Chen et al., 2010; Gioscia-Ryan et al., 2014; Ramasamy et al., 1999; Spirli et al., 2003). Cabe señalar que, en diferentes modelos experimentales de daño hepático, incluyendo la enfermedad hepática colestásica, el ON ha demostrado ejercer un papel tóxico o protector (Biecker et al., 2008; Rodriguez-Ortigosa et al., 2014; Shah et al., 2001; Zimmermann et al., 1996), dependiendo de factores tales como su concentración o fuente a partir de la cual es producido. En nuestro modelo de colestasis *in vitro*, la inducción de daño hepatocelular por GCDCA se asoció a una menor expresión de NOS-3 y a una menor producción de productos finales derivados de la oxidación del ON, nitratos y nitritos. Con el fin de asociar la disminución de la producción de ON con la desregulación de NOS-3 y no con la de cualquier otra isoforma de NOS, a continuación cuantificamos la expresión génica de NOS-1 y NOS-2 en nuestras condiciones experimentales. En ningún caso detectamos expresión de NOS-1 ó NOS-2, ni en condiciones basales ni tras la administración de GCDCA. Pese a que la NOS-1 podría participar en un modelo de cirrosis biliar murino, por ligadura del conducto biliar, en animales deficientes en NOS-3, su expresión ha sido descrita en la aorta hepática (Biecker et al., 2004). De manera similar, aunque en distintos modelos de colestasis en ratas la expresión de NOS-2 es detectada en tejido hepático (Vazquez-Gil et al., 2004) y su inhibición se asocia con una mejoría de la lesión hepatocelular (Lopez-Sanchez et al., 2010), la expresión de dicha isoforma se localiza en los espacios portales y venas centrolobulillares (Vazquez-Gil et al., 2004). Además, se ha demostrado que la presencia de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  estimula la expresión de NOS-2 en cultivos de colangiocitos, en el epitelio biliar de pacientes de CEP en estadio III-IV y en hepatocitos periportales de pacientes de CBP (Spirli et al., 2003). Por lo tanto, dentro del tejido hepático, la expresión de NOS-2 quedaría relegada a regiones muy concretas. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos donde la expresión de ambas



isoformas, NOS-1 y NOS-2, tampoco es detectada en pacientes cirróticos de diversa etiología (incluyendo la colestasis) (McNaughton et al., 2002), ni en tejido hepático normal (Spirli et al., 2003) ni en hepatocitos de rata aislados e incubados con GCDCA (Gumprich et al., 2002), respectivamente.

Nuestro objetivo a continuación fue determinar qué papel desempeña NOS-3 durante la citotoxicidad inducida por GCDCA, y cómo regulan ambos procesos, la  $[Ca^{2+}]_i$  y el estrés oxidativo, la expresión/actividad de la NOS-3 en estas condiciones (Fig. 86).



**Fig. 86. Esquema de los objetivos planteados durante el desarrollo de la tesis doctoral:** estudiar cómo afecta la administración de la sal biliar a la  $[Ca^{2+}]_i$ , cómo afecta el estrés oxidativo y la  $[Ca^{2+}]_i$  a la expresión/actividad de NOS-3 y cómo se relaciona la regulación de NOS-3 con el proceso de muerte celular durante la colestasis.

Pese a que los cambios descritos en la expresión de NOS-3 y en su actividad asociada, acompañan durante la muerte celular por GCDCA (ya que se trata de la única isoforma NOS que se expresa en esta situación), aún no habíamos relacionado un fenómeno con otro. Para ello, utilizamos un inhibidor de la actividad NOS, L-NAME, y un donador de ON, NONOate. Mientras que en presencia de la sal biliar L-NAME provocó un incremento muy significativo de la actividad caspasa-3, la administración del donador de ON la atenuó. De manera similar, Gumprich y cols. demostraron que el tratamiento con NONOate protege

frente a la apoptosis inducida por GCDCA en hepatocitos de rata en cultivo, a través de un mecanismo que implica la inhibición de la actividad caspasa-3 (Gumpricht et al., 2002). Nuestros resultados sugieren que el ON participa en la supervivencia celular durante la colestasis experimental *in vitro* inducida por GCDCA.

La relación entre la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y el desarrollo de daño hepatocelular ha sido demostrada en numerosos trabajos previos. No obstante, el papel exacto que desarrolla dicho ión difiere en función de las condiciones experimentales, pudiendo presentar efectos beneficiosos, perjudiciales o nulos. Por ejemplo: el empleo de cultivos primarios de hepatocitos de rata, incubados en medio con o sin  $\text{Ca}^{2+}$ , en presencia de diversos agentes como el ionóforo A23187, se asoció con un incremento de la muerte celular, siendo esta más acusada en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al afectar a la integridad de la membrana plasmática (Schanne et al., 1979); Acosta y cols. demostraron que la toxicidad inducida por  $\text{CdCl}_2$ , en un cultivo de hepatocitos, es mayor cuando se produce en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (Acosta and Sorensen, 1983); en otros estudios, el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no ejerció efectos significativos sobre la muerte celular en presencia de agentes tóxicos, en cultivos de hepatocitos de rata (Stacey and Klaassen, 1982).

Respecto a la colestasis inducida por GCDCA, también existen algunas contradicciones en cuanto al papel del  $\text{Ca}^{2+}$ , las cuales podrían ser debidas a la concentración de sal biliar empleada en cada caso. Patel y cols. concluyeron que el inicio de la apoptosis inducida por bajas concentraciones de GCDCA ( $50\mu\text{M}$ ) se relacionaba con el incremento de  $\text{Mg}^{2+}$  libre (asociado a una estimulación de endonucleasas dependientes de  $\text{Mg}^{2+}$ ), pero no con un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Patel et al., 1994). Por otro lado, Liang y cols. demostraron que el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico es un factor importante durante la apoptosis inducida por concentraciones más elevadas de GCDCA ( $100\mu\text{M}$ ), al favorecer la apertura del poro mitocondrial en un cultivo de células hepáticas fetales

(Liang et al., 2013). El uso de concentraciones aún más altas de GCDCA (250 $\mu$ M) en hepatocitos aislados de rata, se relacionó con el incremento sostenido de la  $[Ca^{2+}]_i$ , una mayor proteólisis degradativa dependiente de  $Ca^{2+}$ , disfunción mitocondrial y el desarrollo de necrosis en hepatocitos aislados de rata (Spivey et al., 1993). En estudios realizados con mitocondrias aisladas y hepatocitos de rata, el estrés oxidativo inducido por el empleo de diferentes concentraciones de GCDCA, de entre 25 $\mu$ M-500 $\mu$ M, estimuló la necrosis celular y la generación del poro de transición de la membrana mitocondrial, cuya apertura viene favorecida por la unión de  $Ca^{2+}$  al poro, propiciando además la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Sokol et al., 2001).

Nuestros resultados también revelaron un papel destacado para el  $Ca^{2+}$  en el modelo de colestasis experimental establecido, aunque totalmente opuesto a los mencionados anteriormente. Así, la disminución de la expresión de NOS-3 durante la citotoxicidad por GCDCA (500 $\mu$ M) estuvo acompañada de una reducción significativa de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el citosol, asociada probablemente a su acumulación en el RE. Esto explicaría la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  observada tras la adición de GCDCA, así como por qué dejamos de observar dicho efecto cuando bloqueamos la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarco/endoplasmático.

De manera similar a lo observado tras la adición de GCDCA, la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  mediante la administración de EGTA también se relacionó con una menor expresión génica de NOS-3 y una mayor acumulación de LDH en el medio de cultivo extracelular. Por otro lado, y en concordancia con estos resultados, la administración del ionóforo A23187 incrementó la  $[Ca^{2+}]_i$  citosólica y la expresión de NOS-3, tanto en condiciones basales como tras la adición de la sal biliar, disminuyendo de manera energética la muerte celular provocada por GCDCA. Nuestros resultados apoyan un modelo de regulación de la expresión de NOS-3 dependiente de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Mitsuyama et al., 1998). No obstante, a pesar de que la disminución del nivel de transcrito NOS-3 fue similar tras añadir EGTA o GCDCA, la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$

citoplasmático en presencia del quelante fue casi tres veces superior. Esto podría sugerir que la regulación de la expresión de NOS-3 fuese muy sensible a la  $[Ca^{2+}]_i$  o que en la regulación de la expresión de NOS-3 por la sal biliar estuviesen participando otros mecanismos diferentes. La adición de GCDCA tras la preadministración del quelante no causó una reducción adicional de la  $[Ca^{2+}]_i$  ni modificó la ya disminuida expresión de NOS-3, aunque sí provocó un incremento muy significativo de los parámetros relacionados con la muerte celular, actividad caspasa-3 y liberación de LDH.

Al igual que el compuesto A23187 en el presente trabajo, el ácido biliar TUDCA es un potente agonista de  $Ca^{2+}$  utilizado con frecuencia como agente anticoléptico. En hepatocitos en cultivo, TUDCA ejerce su acción favoreciendo la entrada del ión y la activación de la PKC- $\alpha$  dependiente de  $Ca^{2+}$  (Beuers et al., 1996). Este mecanismo resulta fundamental para favorecer la exocitosis vesicular, la cual, además de considerarse una de las principales vías de secreción de los ácidos biliares al participar en la correcta inserción de las proteínas de transporte en la membrana canalicular del hepatocito, se encuentra alterada durante la enfermedad colestásica. Así, la administración de TUDCA o UDCA a ratas sometidas a colestasis crónica y con pérdida de los conductos biliares, protege a los colangiocitos frente a la apoptosis a través de la vía de señalización del  $Ca^{2+}$  y la fosforilación de la PKC- $\alpha$  (Marziani et al., 2006). A pesar de todo ello, existen otros estudios en los que, o bien la vía de señalización del  $Ca^{2+}$  no es considerada un verdadero evento colestásico debido a que se observa un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  tanto con ácidos biliares colestásicos como anticolépticos (Beuers et al., 1993a), o bien existen diferentes mecanismos moleculares a través de los cuales ejercen su acción diferentes ácidos biliares anticolépticos, tales como el TUDCA o el TCA (Gut 2008;57:1448-54).

Los resultados obtenidos a partir de nuestro modelo *in vitro* con GCDCA sí concuerdan con un mecanismo (anti)colestásico dependiente

de la  $[Ca^{2+}]_i$  y el estrés oxidativo. Debido a que el estrés oxidativo es un importante regulador de la  $[Ca^{2+}]_i$  a través de la oxidación de diferentes proteínas que regulan la homeostasis de dicho ión, como la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del RS, el intercambiador de  $Na^+-Ca^{2+}$  y la bomba de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática (Fukui et al., 1994; Hammerschmidt and Wahn, 1998), podría suceder que los cambios observados en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la expresión de NOS-3 tras la adición de la sal biliar fuesen debidos a la acumulación de EROs. En este sentido, el uso de los antioxidantes MitoQ y MnTBAP o NAC, respectivamente, previno o inhibió la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  causada por la administración de la sal biliar, aumentando de manera muy significativa en presencia de MnTBAP, probablemente asociado a su actividad SOD. Estos resultados demuestran que el estrés oxidativo participa en la homeostasis del  $Ca^{2+}$  celular durante el daño hepatocelular inducido por GCDCA. En este sentido, es sabido que las EROS pueden participar como mediadores intercelulares a través de la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , lo cual precede a otras alteraciones morfológicas y funcionales en la célula (Hu et al., 1998; Rosado et al., 2006). Así, el estrés oxidativo mediado por hidroperóxido de terc-butilo (t-BOOH) en células endoteliales cultivadas, inhibe la entrada de  $Ca^{2+}$  estimulada por agonistas y su liberación de los depósitos intracelulares (Elliott et al., 1992).

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos afirmar que el descenso en la  $[Ca^{2+}]_i$  provocado por estrés oxidativo coincidió con la disminución de la expresión de NOS-3 durante la toxicidad inducida por GCDCA. De hecho, el tratamiento antioxidante redujo la acumulación de EROs, previno la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  y recuperó la actividad del pNOS-3, los niveles de expresión de NOS-3 a nivel de ARN y proteína y la producción de ON. La alteración de la producción de ON como consecuencia del incremento de estrés oxidativo ha sido relacionada con diversos mecanismos que incluyen: (1) la deficiencia de L-arginina o de los cofactores implicados en la activación de la NOS; (2) la formación de compuestos tales como el peroxinitrito y el radical  $OH^\bullet$

a partir de la interacción entre el ON y el anión  $O_2^{\cdot-}$ ; y (3) la desregulación de la expresión de la NOS (Chen et al., 2009; Harrison and Ohara, 1995). De este modo, la administración de L-arginina protege frente al estrés oxidativo a través del incremento de la expresión de NOS-3 y la producción de ON, en un modelo animal de fibrosis hepática crónica inducida por  $CCl_4$  (Leung et al., 2008). De forma similar, la suplementación con  $BH_4$  restaura la vasodilatación del endotelio aórtico porcino, incrementando la expresión proteica de NOS-3 y disminuyendo el estrés oxidativo (Wang et al., 2007). Además, el empleo de una molécula inhibidora del anión  $O_2^{\cdot-}$  (LY-83583), en células endoteliales humanas, es capaz de recuperar la expresión de NOS-3. Los resultados obtenidos en nuestro modelo de colestasis *in vitro* concuerdan con un mecanismo de regulación de la expresión génica mediado por estrés oxidativo. En consecuencia, nuestro siguiente objetivo fue investigar los factores que intervienen en este proceso, así como indagar el modo en que dicha isoforma ejerce su acción antiapoptótica.

En cuanto al mecanismo de regulación de la expresión génica de NOS-3 por EROs, existen distintas condiciones relacionadas con la generación de estrés oxidativo que pueden regular positiva (Min et al., 2006) o negativamente (Kumar et al., 2008; Kumar et al., 2009) la actividad transcripcional del pNOS-3. Sin embargo, no existen evidencias bibliográficas sobre qué elementos están implicados en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la citotoxicidad por GCDCA. Así pues, una vez establecida la asociación entre colestasis y muerte celular a través de la regulación de la expresión de NOS-3 por estrés oxidativo, nos propusimos identificar los elementos que pudieran participar en dicho proceso. Tras el análisis bioinformático previo, el número de FTs candidatos a considerar se redujo a dos: Sp1, con tres posibles TFBS, y AP-1, con un único sitio de unión en la secuencia promotora pNOS-3.

Al no haber sido identificado de manera unánime por los tres programas de predicción utilizados, el FT MAZ no fue considerado en el análisis inicial. Tampoco fue tenido en cuenta el FT GATA, el cual, pese a ser identificado en el análisis inicial, no reunía los criterios establecidos para su inclusión. Sin embargo, estos FTs fueron posteriormente incluidos en el estudio debido a que miembros de esta familia pueden unirse al pNOS-3 en distintas posiciones y regular su actividad (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999; Neumann et al., 2004; Song et al., 2003; Zhang et al., 1995). Así, MAZ resultó interesante debido a que los TFBS para MAZ y Sp1 comparten una secuencia similar y suelen estar presentes en los mismos genes. De hecho, Sp1 es capaz de reconocer y unirse a los TFBS de MAZ y viceversa (Song et al., 2001). Además, se ha demostrado que la expresión de NOS-3 está reprimida por la unión de MAZ al pNOS-3 (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999; Song et al., 2003). Por otro lado, los miembros de la familia GATA pueden cooperar con Sp1 (uno de los FTs seleccionados para su análisis) en el proceso de regulación génica, modulando su actividad (Fischer et al., 1993; Lecointe et al., 1994). En el caso de GATA-4, fuimos incapaces de confirmar su unión en la posición -235pb del pNOS-3, ni en condiciones basales ni tras la administración de GCDCA. En cuanto a GATA-1, a pesar de existir unión del FT en la posición descrita del pNOS-3, no observamos diferencias entre la situación basal y la presencia de GCDCA. Considerando el único TFBS analizado, estos datos sugieren que la regulación de la expresión de NOS-3 en nuestras condiciones experimentales es independiente de la unión de GATA-1. Respecto a MAZ, tampoco pudimos confirmar su participación en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la colestasis inducida por GCDCA.

Volviendo a los FTs AP-1 y Sp1, ambos resultaron realmente interesantes en nuestro modelo experimental por varios motivos. En primer lugar, e íntimamente relacionado con nuestras observaciones previas, se trata de FTs sensibles al estado redox celular (Chiu et al.,

2010; Saito et al., 2012). En segundo lugar, cabe señalar que AP-1 participa en la regulación de numerosos genes de mamíferos, frecuentemente en cooperación con otros FTs como Sp1. Así, se ha descrito que la actividad AP-1 depende de la presencia de Sp1 en el mismísimo pNOS-3, siendo ambos factores necesarios para la activación del dicho promotor (Marsden et al., 1993; Xing et al., 2006). En último lugar podríamos destacar que, además de participar en la regulación de la expresión de NOS-3, ambos FTs intervienen en la apoptosis inducida por ácidos biliares (Bernt et al., 2006; Higuchi et al., 2004), fenómeno que hemos asociado a la desregulación de NOS-3. Así, Sp1 se encuentra sobreexpresado en pacientes diagnosticados de colestasis obstructiva que no han recibido terapia previa a la cirugía, localizándose de manera predominante en el núcleo de los hepatocitos (Chai et al., 2012). Por su parte, AP-1 ha sido identificado como una diana de GCDCA, de forma que la acumulación de la sal biliar induce la activación del complejo AP-1 (formado por el heterodímero JunB y cFos) en células HepG2 que expresan de manera estable el transportador de ácidos biliares Ntcp (Bernt et al., 2006). Conclusiones similares a estas fueran obtenidas con TLCA, otro ácido biliar hidrofóbico proapoptótico, pero no con los ácidos biliares hidrofílicos TUDCA y TCA. Es más, el empleo de TUDCA causó la inhibición de la actividad transcripcional de AP-1 inducida por TLCA, sugiriendo que este puede ser uno de los mecanismos por el cual TUDCA ejerce su efecto antiapoptótico (Pusl et al., 2008).

Los resultados del presente trabajo revelaron una respuesta celular frente a GCDCA caracterizada por un aumento de los niveles de expresión y de fosforilación de Sp1, cJun y cFos. En estas mismas condiciones, el empleo de las moléculas antioxidantes NAC, MnTBAP y MitoQ, redujo de forma significativa la expresión y fosforilación de los FTs. Por tanto, estos factores podrían estar participando en la regulación de la expresión de NOS-3 en nuestro modelo de colestasis experimental, mediante un mecanismo mediado por estrés oxidativo.



De acuerdo con el modelo de regulación de FTs, tales como Sp1 y AP-1, a través de la vía de las MAPKs, la administración de GCDCA se asoció con un aumento de la fosforilación de las MAPKs JNK y ERK1/2. Este resultado coincide con observaciones previas donde la acumulación de ácidos biliares se relaciona con la activación de la cascada de señalización de MAPKs y la regulación de los FTs AP-1 y Sp1. Por ejemplo: la inhibición de JNK1/2 bloquea la activación de Sp1 inducida por DCA en células de hepatocarcinoma humano HuH-7 (Higuchi et al., 2004); la fosforilación de JNK se asocia con la sobreexpresión y activación de Sp1 durante la colestasis obstructiva humana (Chai et al., 2012); la activación de AP-1 en células HepG2-Ntcp tratadas con GCDCA es dependiente de la fosforilación de JNK y p38 (Bernt et al., 2006); la forma no conjugada de GCDCA, el ácido CDCA, provoca la activación del complejo AP-1 (heterodímero formado por cJun y cFos) a través de la fosforilación de ERK, en cultivos de células humanas de cáncer de colon (Hirano et al., 1996). Además, al igual que ocurre en nuestro modelo de colestasis experimental, la activación de las MAPKs por acción de los ácidos biliares ha sido relacionada con la acción citotóxica de estos. Así, la apoptosis inducida por TLCA parece estar mediada por AP-1, incrementando la expresión de cFos y JunB a través de una mayor fosforilación de JNK en células HepG2-Ntcp (Pusl et al., 2008).

Del mismo modo al observado previamente con los FTs AP-1 y Sp1, el empleo de los antioxidantes inhibió el efecto de GCDCA sobre JNK y ERK1/2. Este resultado apoya la relación existente entre la acumulación de ácidos biliares y la activación de la cascada de señalización de MAPKs dependiente de estrés oxidativo (Dent et al., 2005; Fang et al., 2004; Pusl et al., 2008). En este sentido, existen diversos estudios que demuestran que las EROs pueden inducir la activación de la vía MAPKs (McCubrey et al., 2006) a través de distintos mecanismos. Por un lado, puesto que las EROs pueden modificar la estructura y función de las proteínas alterando los residuos de

aminoácidos críticos, la modificación oxidativa de los diferentes factores implicados en la cascada de señalización de estas quinasas podría considerarse un posible mecanismo de activación de la vía MAPK ante la acumulación de EROs (Meng et al., 2007; Nagai et al., 2007). Además de este, existe otro posible mecanismo de acción que implica la inactivación y degradación de las fosfatasa MKPs (reguladoras negativas de la vía MAPKs) por estrés oxidativo, el cual ha sido asociado con la inactivación de JNK (Kamata et al., 2005) y ERK (Choi et al., 2006).

El posterior análisis de la capacidad de unión de los FTs a los TFBS previamente identificados en el pNOS-3, reveló una mayor unión de Sp1 en las posiciones -1.386pb, -632pb y -104pb del promotor, en presencia de la sal biliar. De manera similar, GCDCA favoreció la unión de cJun y cFos en la posición -666pb del pNOS-3. Como ya comprobamos al analizar el efecto de la sal biliar sobre la expresión de NOS-3, la mayor unión de Sp1 y AP-1 al pNOS-3 se tradujo en una menor actividad del promotor y una consecuente reducción de la expresión y actividad de NOS-3. Así pues, la activación y mayor unión de los FTs a los TFBS identificados en el pNOS-3 pareció tener un efecto inhibitorio sobre la expresión de NOS-3.

Como hemos mencionado anteriormente, la relación entre el estrés oxidativo y la inducción de la vía de activación de los FTs Sp1 y AP-1 es conocida. No obstante, la mayor unión de estos y otros FTs a regiones concretas del pNOS-3 en diferentes condiciones experimentales ha sido asociada con la regulación positiva de NOS-3 y no con su inhibición. Respecto a Sp1, su unión al pNOS-3 ha sido relacionada con la sobreexpresión de NOS-3 durante el daño ejercido por distintos citotóxicos (Cieslik et al., 1998) o por la presencia de moléculas antioxidantes (Xu et al., 2004). Kumar y cols. observaron que la administración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye la actividad del pNOS-3 de manera similar a como ocurre en nuestro trabajo, pero a través de una menor (no mayor, como nuestro caso) capacidad de unión de Sp1 a la posición

-104pb del promotor (Kumar et al., 2009). En cuanto a AP-1, trabajos previos demuestran que participa en la regulación positiva de NOS-3 en presencia de inmunosupresores como la ciclosporina A (Navarro-Antolin et al., 2000) o en condiciones de hipoxia (Hoffmann et al., 2001), estando ambos fenómenos relacionados con la producción de estrés oxidativo (Murphy, 2009; Wolf et al., 1997). Por el contrario, el ácido nordihidroguairético, un conocido antioxidante, induce la expresión de NOS-3, pero favoreciendo también la unión de AP-1 al pNOS-3 (Kumar et al., 2007). De nuevo, Kumar y cols. demostraron que, mediante su unión al mismo TFBS que analizamos en esta tesis doctoral, AP-1 regulaba positivamente la actividad del pNOS-3, y que la administración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la reducía a través de una menor (no mayor, como nuestro caso) unión del FT al promotor (Kumar et al., 2008).

Para confirmar el papel que ejercen Sp1 y AP-1 en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la colestasis experimental por GCDCA, a continuación utilizamos AT y la MitA como inhibidores específicos de Sp1, y curcumina y quercetina como inhibidores de AP-1. La inhibición específica de Sp1 con MitA o AT protegió frente a la muerte celular inducida por GCDCA a través del mismo mecanismo descrito para los antioxidantes. Así, la inhibición de Sp1 recuperó la actividad del pNOS-3, incrementándose la expresión de NOS-3 y la acumulación de nitritos y nitratos en el medio de cultivo extracelular. Estos resultados sugieren que Sp1 actúa como un inhibidor de la expresión de NOS-3 mediado por GCDCA, y que además no es esencial para la regulación de la expresión de NOS-3 en condiciones basales, de manera opuesta a lo que se ha descrito previamente en otros trabajos donde se demuestra que la actividad basal del pNOS-3 depende de una región rica en G+C, correspondiente a dos sitios de unión para Sp1 (-104/-96 y -99/-91) (Wariishi et al., 1995). De manera similar, la administración de curcumina y quercetina como inhibidores de AP-1 bloqueó la inhibición de la expresión de NOS-3 y de su actividad, provocada por la acumulación de la sal biliar. Sin embargo, estos

compuestos presentan propiedades antioxidantes (Lee et al., 2016; Lin et al., 2014; Vera-Ramirez et al., 2013) y, además, han sido descritos como inhibidores inespecíficos de otros FTs como Sp1 (Chadalapaka et al., 2008; Kang and Chen, 2009; Kim et al., 2008) ó NF-κB (Duvoix et al., 2005; Musonda and Chipman, 1998). De hecho, nuestros resultados revelan que la administración de curcumina y quercetina se relaciona con una menor fosforilación de Sp1 durante la citotoxicidad ejercida por GCDCA. Teniendo en cuenta que Sp1 y el estrés oxidativo participan en la regulación de NOS-3 en nuestro modelo de colestasis, los resultados obtenidos con el uso de ambos compuestos no pueden ser atribuidos a la inhibición específica de AP-1. Por este motivo, recurrimos a otra molécula capaz de inhibir selectivamente a AP-1: SR11302 (Fanjul et al., 1994). El compuesto SR11302 pertenece a ese nuevo grupo de retinoides sintéticos capaces de inhibir la actividad de AP-1 sin activar la transcripción de los elementos de respuesta de los ácidos retinoicos RARE (Fanjul et al., 1994). Debido a esta característica, SR11302 ha perdido los efectos diferenciadores de los ácidos retinoicos, pero conserva su capacidad antiproliferativa. Como esperábamos, la inhibición específica de la actividad AP-1 por SR11302 protegió frente a la muerte celular inducida por GCDCA. Además, al igual que describimos anteriormente con el uso de los antioxidantes o mediante la inhibición de Sp1, este efecto antiapoptótico del retinoide coincidió con la recuperación de la actividad del pNOS-3 y de la expresión y actividad de NOS-3 durante la colestasis por GCDCA. El empleo de concentraciones crecientes de SR11302 se relacionó con un aumento dosis-dependiente de la expresión de NOS-3, tanto en condiciones basales como durante la citotoxicidad ejercida por la sal biliar.

Si bien el efecto inhibidor o represor de Sp1 y AP-1 sobre NOS-3 contradice ciertas observaciones previas en otros modelos experimentales, ambos FTs pueden funcionar también como reguladores negativos de la expresión génica. Por lo que sabemos, el

estudio que aquí presentamos es el primero que identifica un papel represor para AP-1 en la expresión de NOS-3. No obstante, no se trata de un caso excepcional. Kleinert y cols. observaron una reducción de la actividad del pNOS-2 inducida por citoquinas, asociada a la sobreexpresión del dímero de AP-1 formado por cJun y cFos, en células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal (Kleinert et al., 1998). En otro estudio, la delección del TFBS para AP-1 localizado en la posición -1.062pb del pNOS-2 murino, incrementó la actividad del promotor en los macrófagos, revelando un papel negativo para AP-1 sobre la transcripción del gen (referido en (Kleinert et al., 1998)). Sin embargo, a pesar de que existen varios trabajos que atribuyen a AP-1 un papel inhibidor sobre la expresión de NOS-2, los mecanismos moleculares subyacentes se desconocen en la actualidad. Por su parte, Sp1 es capaz de activar/reprimir la transcripción génica (Doetzlhofer et al., 1999). Relacionado con la expresión de NOS-3, Neumann y cols. describieron cómo la actividad del pNOS-3 era inhibida por TNF- $\alpha$  al favorecerse la unión de un miembro de la familia de Sp, Sp3, a la posición -370pb del promotor, disminuyéndose la actividad del pNOS-3 en células endoteliales de los microvasos de pulmón bovino (Neumann et al., 2004).

Es importante mencionar en este punto que la deacetilación de histonas y la metilación del ADN han sido propuestos como mecanismos de represión sinérgica de la expresión de NOS-3, que podemos relacionar con el FT Sp1. El pNOS-3 se encuentra fuertemente metilado en células no endoteliales, reprimiendo en consecuencia su actividad (Chan et al., 2004). Como regulador negativo, se ha demostrado que Sp1 puede interaccionar directamente con la histona deacetilasa HDAC1, causando una represión reversible de la transcripción por deacetilación de las histonas (Sowa et al., 1997). En este sentido, existen evidencias experimentales que indican que la expresión de NOS-3 podría estar regulada por el reclutamiento de HDAC1 en el promotor, a través de la unión directa con Sp1 y con la

participación de la proteína MeCP2, un represor transcripcional capaz de reclutar a las HDCAs en regiones específicas de ADN metilado (Gan et al., 2005). En nuestro modelo celular, la asociación entre HDACs y Sp1 en regiones metiladas del pNOS-3, podría estar ejerciendo un papel clave en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la enfermedad hepática colestásica. No obstante estas consideraciones no han sido abordadas en el presente proyecto de tesis doctoral, siendo necesarias investigaciones adicionales para clarificar esta hipótesis.

Aunque la actividad de AP-1 puede antagonizar con la apoptosis en algunos tipos de tumores (incluidos los hepáticos) a través de la inhibición p53 (Eferl et al., 2003), y los genes de la familia Bcl2 propuestos como dianas antiapoptóticas reguladas por AP-1 (Eferl and Wagner, 2003), la inhibición de AP-1 por SR11302 en la línea celular HepG2 no indujo la actividad caspasa-3 y no se asoció con la acumulación de células muertas. Sin embargo, y de acuerdo con su conocida capacidad antitumoral (Huang et al., 1997a; Li et al., 1996), la administración de SR11302 se relacionó con la alteración de la proliferación celular. Cuando profundizamos en la capacidad antiproliferativa de SR11302, observamos que la administración del retinoide en condiciones basales se asociaba con la inhibición de la expresión de la ciclina D1, la cual regula la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular a través de su unión a las CDKs. Además, de forma independiente a la actividad CDK, la ciclina D1 puede unirse a diferentes receptores nucleares, e incluso a histonas (de)acetilasas, para regular la proliferación celular (Han et al., 1999). Así pues, no es de extrañar que la expresión aberrante de ciclina D1 esté asociada al desarrollo de tumores y mantenimiento del fenotipo maligno (Hunter and Pines, 1994; Zhang et al., 2009).

Entre muchos otros, el promotor del gen de la ciclina D1 contiene dos TFBS para AP-1, a los cuales pueden unirse proteínas pertenecientes a las familias de cJun, cFos y ATF y regular la expresión de la ciclina D1 (Shaulian and Karin, 2001; Verde et al., 2007; Zhang et

al., 2009). De acuerdo con nuestros resultados, la inhibición de AP-1 mediante el empleo de ácidos retinoicos provoca la acumulación de células en la fase G1 a través de la inhibición de la expresión del complejo ciclina D1-CDK4 y de la sobreexpresión de p21 (Zhang et al., 2014) y p27 (Park et al., 2011). No obstante, aunque la ciclina D1 promueve la progresión del ciclo celular, su sobreexpresión puede provocar una transición prematura hacia la fase S y favorecer la entrada en apoptosis (Han et al., 1999) (Han et al., 1996). Por tanto, la ciclina D1 puede promover el crecimiento celular o ejercer un efecto proapoptótico dependiendo de factores tales como su nivel de expresión, el tipo celular o el contexto celular en el que se encuentre (Han et al., 1999).

En lo que respecta a la colestasis hepática En este sentido, la preincubación celular con UDCA y TUDCA abolió la sobreexpresión de la ciclina D1 y la apoptosis (Castro et al., 2007). De manera similar, nosotros también asociamos la inducción de la apoptosis por GCDCA con un incremento de ciclina D1. En estas condiciones, la inhibición de la expresión de ciclina D1 por SR11302, además de disminuir la actividad metabólica y la capacidad proliferativa celular, redujo la citotoxicidad de la sal biliar a través de la inhibición de la actividad caspasa-3.

Así pues, en nuestro modelo experimental de colestasis, la inhibición de la actividad de AP-1 mediante el bloqueo farmacológico con SR11302 se relacionó con la protección frente a la muerte celular inducida por GCDCA a través de la inhibición de la actividad caspasa-3. Este resultado concuerda con trabajos previos donde se demuestra la importancia de la apoptosis en el daño hepático durante la enfermedad colestásica y la participación de AP-1 en este proceso (Bernt et al., 2006). Además, el efecto del retinoide se relacionó con dos fenómenos *a priori* independientes: la recuperación y la inhibición de la expresión de NOS-3 y ciclina D1, respectivamente. Afortunadamente, el uso del inhibidor de la actividad NOS, L-NAME, permitió analizar estos dos

fenómenos en paralelo. Puesto que la expresión de NOS-3 era inhibida en presencia de GCDCA, resulta lógico que el tratamiento con L-NAME no ejerciera efecto alguno sobre la expresión de la ciclina D1 o la proliferación celular. Sin embargo, L-NAME bloqueó el efecto antiapoptótico de SR11302, pudiendo relacionar de esta forma la recuperación de la expresión de NOS-3 con la capacidad protectora del retinoide. Así, en presencia de L-NAME, el compuesto SR11302 no logró reducir la expresión de ciclina D1 ni la actividad caspasa-3 durante la citotoxicidad inducida por GCDCA. Puesto que en nuestro modelo celular de colestasis no fuimos capaces de detectar la expresión de NOS-1 ni de NOS-2, los resultados sugieren que la regulación de la expresión de NOS-3 por AP-1 puede ser un proceso clave en el daño hepatocelular durante la enfermedad colestásica. En conjunto, estos hallazgos relacionan los efectos tóxicos de los ácidos biliares con la sobreexpresión de la ciclina D1 a través de la inhibición de la expresión de NOS-3 por AP-1, en un proceso regulado por estrés oxidativo.

Los resultados del modelo de colestasis *in vivo* que se recogen en el presente trabajo de tesis fueron obtenidos a partir de muestras de animales utilizados en otro trabajo previo, en el que se llevó a cabo un modelo experimental consolidado ampliamente descrito en literatura, que consiste en la ligadura de la vía biliar. Así pues, pese a que no pudieron ser evaluadas todas las condiciones experimentales que nos hubiera gustado ni pudimos analizar todos los parámetros deseados, los resultados obtenidos nos ayudan a validar los resultados del modelo *in vitro*.

En el modelo experimental de colestasis *in vivo*, la ligadura del conducto biliar se asoció con un aumento significativo de la relación peso del hígado/peso corporal, como resultado de la acumulación de sales biliares en el hígado, una mayor proliferación ductular y fibrosis hepática (Lopez-Sanchez et al., 2010; Roskams and Desmet, 1998). De acuerdo con el estudio *in vitro*, la disminución de la defensa antioxidante en el tejido hepático colestásico, la cual refleja la respuesta



hepática frente al estrés oxidativo (Pastor et al., 1997; Tiao et al., 2009) se relacionó con la activación de los FTs Sp1, cJun y cFos, la inhibición de la expresión de NOS-3 y el daño hepatocelular. Así, se observó un incremento de la actividad caspasa-3 y de los niveles séricos de las enzimas hepáticas GGT, AST y ALT y de bilirrubina.

Es importante destacar que, mientras la expresión de NOS-3 se encontraba disminuida, los niveles de transcritos de NOS-2 a nivel hepático y los niveles circulantes de nitritos y nitratos en plasma eran significativamente superiores en los animales BDL respecto a los controles (Lopez-Sanchez et al., 2010). Debido a esto, la sobreexpresión de NOS-2 se ha relacionado con el daño hepatocelular en este grupo de animales. Por lo tanto, y teniendo en cuenta todas estas observaciones, los efectos adversos inducidos por el ON durante el daño colestásico podrían deberse a la sobreexpresión de NOS-2 y/o a la inhibición de la expresión de NOS-3. Esto coincide con estudios previos donde la progresión de la fibrosis hepática ocurre como resultado de la expresión desregulada de ambas isoformas de la NOS (Leung et al., 2008). Por otro lado, uno de los acontecimientos clave durante la cirrosis es el aumento de la presión intrahepática, el cual podría ser debido a una menor producción de ON como consecuencia de inhibición de la actividad NOS-3, debido a la unión de esta a la caveolina (Shah et al., 1999; Wei et al., 2002). En cuanto a la expresión de NOS-2 en los hepatocitos de animales cirróticos, podría verse incrementada para compensar las pequeñas cantidades de ON generadas por NOS-3, difundiendo por los sinusoides hepáticos. Sin embargo, a medida que la cirrosis progresa se produce un fenómeno de capilarización, generándose una barrera que puede dificultar la difusión del ON. En consecuencia, la acumulación de ON sintetizado por NOS-2 en las proximidades de los hepatocitos podría contribuir a la generación de peroxinitritos, los cuales dañarían a las células hepáticas en estadios más avanzados de la cirrosis (Wei et al., 2002). Otros estudios han demostrado que la inducción de NOS-2 se asocia con el crecimiento de

los colangiocitos (Ishimura et al., 2004), contribuyendo al desarrollo de fibrosis hepática (Omenetti et al., 2008). Por el contrario, la inhibición de la síntesis de ON con S-metilisotiourea, un inhibidor de la NOS-2, causa una reducción significativa de la proliferación de los colangiocitos, disminuyendo la fibrosis periportal y la lesión hepatocelular tras la obstrucción biliar (Lopez-Sanchez et al., 2010).

Durante la colestasis, la acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos se ha relacionado con el desarrollo de inflamación y la generación de una respuesta inflamatoria a través de la liberación de DAMPs. Estas moléculas son responsables de la activación de las células de Kupffer (macrófagos residentes en el hígado) y del reclutamiento de monocitos y neutrófilos en el lugar de la lesión. Este hecho puede ser relevante en nuestro modelo de colestasis *in vivo* debido a que la activación de macrófagos resulta ser una importante fuente de EROs (Jaeschke, 2011) y de ON derivado de NOS-2 (Lowenstein and Padalko, 2004), y además se asocia con diversos modelos de daño hepático por inflamación, como el daño hepático generado durante la isquemia reperusión, la hepatitis alcohólica o la endotoxemia, incluida la colestasis obstructiva. Así pues, está aceptado que las células inmunes innatas, incluyendo las células de Kupffer y los macrófagos infiltrantes, se activan después del daño hepático pudiendo deteriorar la lesión hepática inicial (Jaeschke, 2006). De acuerdo con este modelo, nosotros encontramos evidencias histológicas de invasión por macrófagos del tejido hepático procedente de animales sometidos a BDL. Debido a esto, no podemos descartar un papel significativo para la invasión por macrófagos en la regulación de la expresión de NOS-3 por estrés oxidativo durante la colestasis, o en el cambio de la relación de expresión NOS-2/NOS-3 durante la progresión de la lesión hepática crónica. Por tanto, se requieren estudios complementarios para comprobar si en el modelo *in vivo* de obstrucción biliar la regulación de la expresión de NOS-3 resulta un fenómeno importante en el desarrollo de daño hepático, y si depende de la unión de Sp1 y AP-1 al pNOS-3.

Atendiendo a los resultados obtenidos, la regulación de la actividad NOS-3 por estrés oxidativo y la participación de Sp1, cJun y cFos en este proceso representan un nuevo mecanismo por el que la acumulación de los ácidos biliares parece ejercer su efecto citotóxico. Esto podría proporcionar nuevas dianas terapéuticas que permitan en un futuro el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad hepática colestásica. Se requieren investigaciones adicionales para determinar el valor terapéutico de los inhibidores Sp1 para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas. Cabe señalar que el AT es un fármaco AIDS con propiedades antiinflamatorias y analgésicas empleado en la clínica actual. No obstante, su aplicación resulta limitada por los efectos secundarios que presenta su uso. Entre ellos destaca la toxicidad gastrointestinal y la disfunción renal relacionada con la dosis (Bjorkman, 1998; Ziakas et al., 2005), y la lesión hepática inducida asociada a una reacción inmunológica o a una alteración en la metabolización del fármaco, siendo más frecuente en pacientes que presentan una enfermedad inmunológica, como la artritis reumatoide o el lupus sistémico eritematoso (Bjorkman, 1998). Por otra parte, el empleo del antibiótico MitA, pese a mostrar una tasa de respuesta positiva, ha sido limitado por no disponer de una ventana terapéutica segura, presentándose efectos secundarios tóxicos e indeseables como la disfunción hepática, en dosis comúnmente utilizadas para tratar diferentes enfermedades (Green and Donehower, 1984; Nunez et al., 2012). Por lo tanto, la valoración del poder terapéutico de estos fármacos debe realizarse con suma cautela, prestando especial atención a la dosis del fármaco y al tiempo de tratamiento, ya que ambas moléculas son transportadas al hígado y secretadas en el intestino a través de la bilis, durante varios ciclos de reciclado (Pentikainen et al., 1984). Por lo tanto, durante la obstrucción biliar, la acumulación de estos compuestos en el hígado y en la vesícula biliar podría tener consecuencias perjudiciales. Por otro lado, el uso combinado de ambas moléculas también debería ser

considerado, ya que podría presentar una ventaja frente a la inhibición de Sp1 con el empleo individual de cualquiera de ellas. Así Jia y cols. demostraron un efecto sinérgico positivo de ambos compuestos en la lucha contra el cáncer pancreático (Jia et al., 2010).

Existen diversos trabajos donde se sugiere que el uso combinado de los retinoides con UDCA podría resultar eficaz para el tratamiento de las enfermedades colestásicas, a través de numerosos mecanismos que incluyen: la reducción del conjunto de ácidos biliares mediante la represión de la expresión de CYP7A1, en células HepG2 y en cultivos de hepatocitos primarios humanos (He et al., 2011); la disminución de los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina y de la proliferación de los conductos biliares, en un modelo clásico de colestasis en ratas sometidas a  $\alpha$ -naftilisotiocianato y en un modelo de colangitis esclerosante con ratones Mdr2<sup>-/-</sup> (Cai et al., 2010); la disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias y de otros mecanismos descritos anteriormente, en ratas sometidas a BDL (He et al., 2011). En este último estudio, el tratamiento combinado condujo a una respuesta terapéutica mejorada, incluyendo el crecimiento animal y la histología hepática.

A pesar de los beneficios reportados por los retinoides, su uso también resulta limitado por su toxicidad (Pfahl et al., 1994). No obstante, este perfil de seguridad inadecuado ha sido asociado a su capacidad transactivadora de elementos RARE y no a su capacidad de inhibición de AP-1, la cual se relaciona con sus propiedades antiproliferativa y antitumoral (Huang et al., 1997a; Li et al., 1996; Pfahl et al., 1994). SR11302 pertenece a una clase de retinoides que han perdido su capacidad transactivadora y que, por tanto, presenta efectos secundarios reducidos en su uso (Fanjul et al., 1994; Li et al., 1996). Así pues, la aparente seguridad de SR11302 frente a MitA y TA convierte al retinoide en una interesante alternativa terapéutica. Su uso, en monoterapia o combinada con UDCA, es una cuestión interesante que se debería abordar en el futuro.

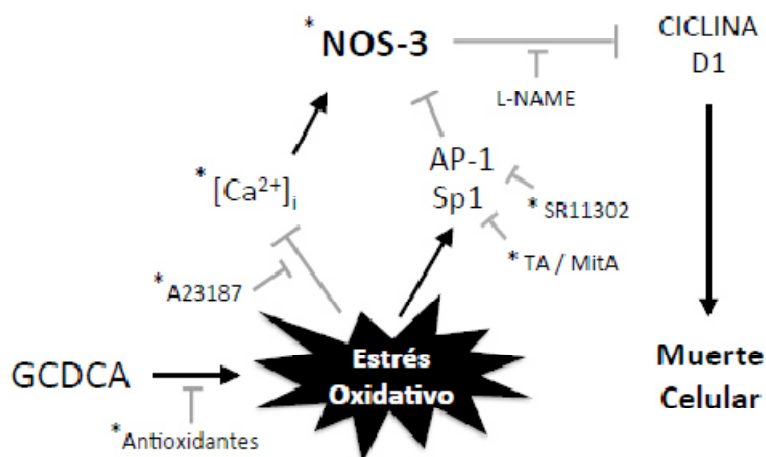


## **VII. CONCLUSIONES**



1. El daño hepatocelular provocado por GCDCA se asocia con una menor expresión de NOS-3 y una menor acumulación de los productos finales del ON.
2. La desregulación de la expresión de NOS-3 durante la citotoxicidad por GCDCA coincide con la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el citosol, asociada a su acumulación en el RE. Este efecto es dependiente de la generación de estrés oxidativo celular.
3. Sp1 y AP-1 actúan como represores transcripcionales de la expresión de NOS-3 y favorecen la muerte celular durante la colestasis experimental.
4. NOS-3 ejerce un papel crítico en la regulación de la expresión de ciclina D1 durante el daño celular inducido por GCDCA.
5. Se requieren investigaciones adicionales para determinar el valor terapéutico de los inhibidores de Sp1 y de AP-1 para el tratamiento de las enfermedades hepáticas colestásicas.

**Esquema de los objetivos alcanzados.** El estrés oxidativo por la acumulación de la sal biliar se relaciona con la muerte celular a través de la inhibición de NOS-3 en un proceso mediado por la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la sobreexpresión de AP-1 y el incremento de ciclina D1. Alternativamente, el estrés oxidativo se asoció con la mayor expresión de Sp1, la inhibición de NOS-3 y la muerte celular durante la colestasis experimental. Las flechas indican activación o inducción; las líneas, inhibición; las moléculas con asterisco se relacionan con supervivencia; el resto, con muerte celular.







## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abdelrahim, M., Baker, C.H., Abbruzzese, J.L., and Safe, S. (2006). Tolfenamic acid and pancreatic cancer growth, angiogenesis, and Sp protein degradation. *J Natl Cancer Inst* 98, 855-868.
- Aboutwerat, A., Pemberton, P.W., Smith, A., Burrows, P.C., McMahon, R.F., Jain, S.K., and Warnes, T.W. (2003). Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochim Biophys Acta* 1637, 142-150.
- Acosta, D., and Sorensen, E.M. (1983). Role of calcium in cytotoxic injury of cultured hepatocytes. *Ann N Y Acad Sci* 407, 78-92.
- Acquaviva, R., Lanteri, R., Li Destri, G., Caltabiano, R., Vanella, L., Lanzafame, S., Di Cataldo, A., Li Volti, G., and Di Giacomo, C. (2009). Beneficial effects of rutin and L-arginine coadministration in a rat model of liver ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G664-670.
- Adlam, V.J., Harrison, J.C., Porteous, C.M., James, A.M., Smith, R.A., Murphy, M.P., and Sammut, I.A. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 19, 1088-1095.
- Aguilar-Melero, P., Ferrin, G., and Muntane, J. (2012). Effects of nitric oxide synthase-3 overexpression on post-translational modifications and cell survival in HepG2 cells. *J Proteomics* 75, 740-755.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615.
- Ali, A.H., Tabibian, J.H., Carey, E.J., and Lindor, K.D. (2016). Emerging drugs for the treatment of Primary Biliary Cholangitis. *Expert Opin Emerg Drugs*.
- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A.B., Bravo, L., and Goya, L. (2006). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 110-118.

- Alpini, G., Phillips, J.O., Vroman, B., and LaRusso, N.F. (1994). Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* 20, 494-514.
- Amaya, M.J., and Nathanson, M.H. (2013). Calcium signaling in the liver. *Compr Physiol* 3, 515-539.
- Amaya, M.J., and Nathanson, M.H. (2014). Calcium signaling and the secretory activity of bile duct epithelia. *Cell Calcium* 55, 317-324.
- Andrade, V., Guerra, M., Jardim, C., Melo, F., Silva, W., Ortega, J.M., Robert, M., Nathanson, M.H., and Leite, F. (2011). Nucleoplasmic calcium regulates cell proliferation through legumain. *J Hepatol* 55, 626-635.
- Angulo, P. (2002). Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 4, 37-44.
- Angulo, P., and Lindor, K.D. (1999). Primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 30, 325-332.
- Anwer, M.S., Engelking, L.R., Nolan, K., Sullivan, D., Zimniak, P., and Lester, R. (1988). Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca<sup>++</sup> activity of isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 8, 887-891.
- Attili, A.F., Angelico, M., Cantafora, A., Alvaro, D., and Capocaccia, L. (1986). Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med Hypotheses* 19, 57-69.
- Atucha, N., Iyu, D., De Rycker, M., Soler, A., and Garcia-Estan, J. (2003). Altered calcium regulation in freshly isolated aortic smooth muscle cells from bile duct-ligated rats: role of nitric oxide. *Cell Calcium* 33, 129-135.
- Bandara, L.R., Buck, V.M., Zamanian, M., Johnston, L.H., and La Thangue, N.B. (1993). Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J* 12, 4317-4324.
- Barta, A., Janega, P., Babal, P., Murar, E., Cebova, M., and Pechanova, O. (2015). The effect of curcumin on liver fibrosis in the rat model of microsurgical cholestasis. *Food Funct* 6, 2187-2193.

- Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptosis. *EMBO J* 23, 1207-1216.
- Bataller, R., Schwabe, R.F., Choi, Y.H., Yang, L., Paik, Y.H., Lindquist, J., Qian, T., Schoonhoven, R., Hagedorn, C.H., Lemasters, J.J., *et al.* (2003). NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 112, 1383-1394.
- Batinic-Haberle, I., Cuzzocrea, S., Reboucas, J.S., Ferrer-Sueta, G., Mazzon, E., Di Paola, R., Radi, R., Spasojevic, I., Benov, L., and Salvemini, D. (2009). Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-specific *Escherichia coli* model and carrageenan-induced pleurisy. *Free Radic Biol Med* 46, 192-201.
- Batinic-Haberle, I., Reboucas, J.S., and Spasojevic, I. (2010). Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Antioxid Redox Signal* 13, 877-918.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127-1155.
- Bernt, C., Vennegeerts, T., Beuers, U., and Rust, C. (2006). The human transcription factor AP-1 is a mediator of bile acid-induced liver cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 800-806.
- Berridge, M.J., and Irvine, R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.
- Berzigotti, A., Bellot, P., De Gottardi, A., Garcia-Pagan, J.C., Gagnon, C., Spenard, J., and Bosch, J. (2010). NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of UDCA, does not decrease portal pressure in patients with cirrhosis: results of a randomized, double-blind, dose-escalating study. *Am J Gastroenterol* 105, 1094-1101.
- Bessho, K., and Bezerra, J.A. (2011). Biliary atresia: will blocking inflammation tame the disease? *Annu Rev Med* 62, 171-185.

- Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G.A., Keppler, D., Paumgartner, G., and Dombrowski, F. (2001). Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 33, 1206-1216.
- Beuers, U., Gershwin, M.E., Gish, R.G., Invernizzi, P., Jones, D.E., Lindor, K., Ma, X., Mackay, I.R., Pares, A., Tanaka, A., *et al.* (2015). Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis'. *J Hepatol* 63, 1285-1287.
- Beuers, U., Nathanson, M.H., and Boyer, J.L. (1993a). Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 104, 604-612.
- Beuers, U., Nathanson, M.H., Isales, C.M., and Boyer, J.L. (1993b). Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca<sup>++</sup> mechanisms defective in cholestasis. *J Clin Invest* 92, 2984-2993.
- Beuers, U., Probst, I., Soroka, C., Boyer, J.L., Kullak-Ublick, G.A., and Paumgartner, G. (1999). Modulation of protein kinase C by tauroolithocholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 29, 477-482.
- Beuers, U., Throckmorton, D.C., Anderson, M.S., Isales, C.M., Thasler, W., Kullak-Ublick, G.A., Sauter, G., Koebe, H.G., Paumgartner, G., and Boyer, J.L. (1996). Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 110, 1553-1563.
- Bharrhan, S., Chopra, K., Arora, S.K., Toor, J.S., and Rishi, P. (2012). Down-regulation of NF-kappaB signalling by polyphenolic compounds prevents endotoxin-induced liver injury in a rat model. *Innate Immun* 18, 70-79.
- Biecker, E., Neef, M., Sagesser, H., Shaw, S., Koshy, A., and Reichen, J. (2004). Nitric oxide synthase 1 is partly compensating for nitric

oxide synthase 3 deficiency in nitric oxide synthase 3 knock-out mice and is elevated in murine and human cirrhosis. *Liver Int* 24, 345-353.

- Biecker, E., Trebicka, J., Kang, A., Hennenberg, M., Sauerbruch, T., and Heller, J. (2008). Treatment of bile duct-ligated rats with the nitric oxide synthase transcription enhancer AVE 9488 ameliorates portal hypertension. *Liver Int* 28, 331-338.
- Birch-Machin, M.A., and Turnbull, D.M. (2001). Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biol* 65, 97-117.
- Bjorkman, D. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated toxicity of the liver, lower gastrointestinal tract, and esophagus. *Am J Med* 105, 17S-21S.
- Black, J.D. (2000). Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci* 5, D406-423.
- Blomhoff, R., and Wake, K. (1991). Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 5, 271-277.
- Blow, J.J., and Nurse, P. (1990). A cdc2-like protein is involved in the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 62, 855-862.
- Blum, J., and Fridovich, I. (1985). Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 240, 500-508.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T., and Snyder, S.H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 1051-1061.
- Boujedidi, H., Bouchet-Delbos, L., Cassard-Doulcier, A.M., Njike-Nakseu, M., Maitre, S., Prevot, S., Dagher, I., Agostini, H., Voican, C.S., Emilie, D., *et al.* (2012). Housekeeping gene variability in the liver of alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 36, 258-266.



- Boyer, J.L. (2013). Bile formation and secretion. *Compr Physiol* 3, 1035-1078.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brown, G.C. (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1504, 46-57.
- Brown, J.H., and Kennedy, B.J. (1965). Mithramycin in the Treatment of Disseminated Testicular Neoplasms. *N Engl J Med* 272, 111-118.
- Bruce, J.I., Straub, S.V., and Yule, D.I. (2003). Crosstalk between cAMP and Ca<sup>2+</sup> signaling in non-excitabile cells. *Cell Calcium* 34, 431-444.
- Bruck, R., Nathanson, M.H., Roelofsen, H., and Boyer, J.L. (1994). Effects of protein kinase C and cytosolic Ca<sup>2+</sup> on exocytosis in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 20, 1032-1040.
- Burcham, P.C., and Harman, A.W. (1990). Mitochondrial dysfunction in paracetamol hepatotoxicity: in vitro studies in isolated mouse hepatocytes. *Toxicol Lett* 50, 37-48.
- Cai, S.Y., He, H., Nguyen, T., Mennone, A., and Boyer, J.L. (2010). Retinoic acid represses CYP7A1 expression in human hepatocytes and HepG2 cells by FXR/RXR-dependent and independent mechanisms. *J Lipid Res* 51, 2265-2274.
- Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P.J., Pozo, M.J., and Camello, P.J. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C1082-1088.
- Carafoli, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56, 395-433.
- Carubbi, F., Guicciardi, M.E., Concari, M., Loria, P., Bertolotti, M., and Carulli, N. (2002). Comparative cytotoxic and cytoprotective effects of taurohyodeoxycholic acid (THDCA) and

tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) in HepG2 cell line. *Biochim Biophys Acta* 1580, 31-39.

- Castro, R.E., Amaral, J.D., Sola, S., Kren, B.T., Steer, C.J., and Rodrigues, C.M. (2007). Differential regulation of cyclin D1 and cell death by bile acids in primary rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G327-334.
- Catar, R., Witowski, J., Wagner, P., Annett Schramm, I., Kawka, E., Philippe, A., Dragun, D., and Jorres, A. (2013). The proto-oncogene c-Fos transcriptionally regulates VEGF production during peritoneal inflammation. *Kidney Int* 84, 1119-1128.
- Cieslik, K., Zembowicz, A., Tang, J.L., and Wu, K.K. (1998). Transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 273, 14885-14890.
- Ciocca, M., and Alvarez, F. (2009). [Genetic cholestasis]. *Arch Argent Pediatr* 107, 340-346.
- Clemens, M.G. (1998). Does altered regulation of eNOS in sinusoidal endothelial cells determine increased intrahepatic resistance leading to portal hypertension? *Hepatology* 27, 1745-1747.
- Clemens, M.G. (1999). Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 30, 1-5.
- Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Miranda, M., Ardite, E., Mari, M., Morales, A., Corrales, F., Kaplowitz, N., and Fernandez-Checa, J.C. (1998). Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 115, 1541-1551.
- Coleman, R. (1987). Bile salts and biliary lipids. *Biochem Soc Trans* 15 Suppl, 68S-80S.
- Colombo, C., Battezzati, P.M., Podda, M., Bettinardi, N., and Giunta, A. (1996). Ursodeoxycholic acid for liver disease associated with cystic fibrosis: a double-blind multicenter trial. The Italian Group for the Study of Ursodeoxycholic Acid in Cystic Fibrosis. *Hepatology* 23, 1484-1490.

- Collin, R., Griffiths, H., Polaczar, S.V., Lawrence, A.C., and Watmore, A. (1989). Mithramycin therapy for resistant hypercalcaemia in transformed chronic granulocytic leukaemia. *Clin Lab Haematol* 11, 156-159.
- Congiu, M., Slavin, J.L., and Desmond, P.V. (2011). Expression of common housekeeping genes is affected by disease in human hepatitis C virus-infected liver. *Liver Int* 31, 386-390.
- Copple, B.L., Jaeschke, H., and Klaassen, C.D. (2010). Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. *Semin Liver Dis* 30, 195-204.
- Coskun, U., Ozenirler, S., Sancak, B., and Bukan, N. (2001). Serum and ascitic fluid nitrate levels in patients with cirrhosis. *Clin Chim Acta* 306, 127-132.
- Crosignani, A., Podda, M., Battezzati, P.M., Bertolini, E., Zuin, M., Watson, D., and Setchell, K.D. (1991). Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration. *Hepatology* 14, 1000-1007.
- Cruz, L.N., Guerra, M.T., Kruglov, E., Mennone, A., Garcia, C.R., Chen, J., and Nathanson, M.H. (2010). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 by calcium signaling in mouse liver. *Hepatology* 52, 327-337.
- Chadalapaka, G., Jutooru, I., Chintharlapalli, S., Papineni, S., Smith, R., 3rd, Li, X., and Safe, S. (2008). Curcumin decreases specificity protein expression in bladder cancer cells. *Cancer Res* 68, 5345-5354.
- Chai, J., He, Y., Cai, S.Y., Jiang, Z., Wang, H., Li, Q., Chen, L., Peng, Z., He, X., Wu, X., *et al.* (2012). Elevated hepatic multidrug resistance-associated protein 3/ATP-binding cassette subfamily C 3 expression in human obstructive cholestasis is mediated through tumor necrosis factor alpha and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase-signaling pathway. *Hepatology* 55, 1485-1494.

- Chan, Y., Fish, J.E., D'Abreo, C., Lin, S., Robb, G.B., Teichert, A.M., Karantzoulis-Fegaras, F., Keightley, A., Steer, B.M., and Marsden, P.A. (2004). The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem* 279, 35087-35100.
- Chance, B., and Williams, G.R. (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176, 250-254.
- Chandran, K., Aggarwal, D., Migrino, R.Q., Joseph, J., McAllister, D., Konorev, E.A., Antholine, W.E., Zielonka, J., Srinivasan, S., Avadhani, N.G., *et al.* (2009). Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q. *Biophys J* 96, 1388-1398.
- Chari, R.S., Schutz, S.M., Haebig, J.E., Shimokura, G.H., Cotton, P.B., Fitz, J.G., and Meyers, W.C. (1996). Adenosine nucleotides in bile. *Am J Physiol* 270, G246-252.
- Chen, C., Chai, H., Wang, X., Lin, P.H., and Yao, Q. (2009). Chlamydia heat shock protein 60 decreases expression of endothelial nitric oxide synthase in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 83, 768-777.
- Chen, C., Jiang, J., Lu, J.M., Chai, H., Wang, X., Lin, P.H., and Yao, Q. (2010). Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H193-201.
- Chen, J.Y., Penco, S., Ostrowski, J., Balaguer, P., Pons, M., Starrett, J.E., Reczek, P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1995). RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *EMBO J* 14, 1187-1197.
- Chiang, J.Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50, 1955-1966.
- Chiu, W.C., Chen, C.J., Lee, T.S., Chen, Z.J., Ke, P.H., and Chiang, A.N. (2010). Oxidative stress enhances AP-1 and NF-kappaB-

mediated regulation of beta(2)-glycoprotein I gene expression in hepatoma cells. *J Cell Biochem* 111, 988-998.

- Choi, B.H., Hur, E.M., Lee, J.H., Jun, D.J., and Kim, K.T. (2006). Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *J Cell Sci* 119, 1329-1340.
- Choi, K.C., Chung, W.T., Kwon, J.K., Yu, J.Y., Jang, Y.S., Park, S.M., Lee, S.Y., and Lee, J.C. (2010). Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B1-induced hepatic damage in mice. *Food Chem Toxicol* 48, 2747-2753.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Chung, H.T., Pae, H.O., Choi, B.M., Billiar, T.R., and Kim, Y.M. (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1075-1079.
- da Silva, D.C., DeFreitas-Silva, G., do Nascimento, E., Reboucas, J.S., Barbeira, P.J., de Carvalho, M.E., and Idemori, Y.M. (2008). Spectral, electrochemical, and catalytic properties of a homologous series of manganese porphyrins as cytochrome P450 model: the effect of the degree of beta-bromination. *J Inorg Biochem* 102, 1932-1941.
- Dahm, L.J., Hewett, J.A., and Roth, R.A. (1988). Bile and bile salts potentiate superoxide anion release from activated, rat peritoneal neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 95, 82-92.
- Darzynkiewicz, Z., Smolewski, P., and Bedner, E. (2001). Use of flow and laser scanning cytometry to study mechanisms regulating cell cycle and controlling cell death. *Clin Lab Med* 21, 857-873.
- Day, B.J., Batinic-Haberle, I., and Crapo, J.D. (1999). Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 26, 730-736.
- Day, B.J., Fridovich, I., and Crapo, J.D. (1997). Manganic porphyrins possess catalase activity and protect endothelial cells against

hydrogen peroxide-mediated injury. *Arch Biochem Biophys* 347, 256-262.

- de Andrade, K.Q., Moura, F.A., Dos Santos, J.M., de Araujo, O.R., de Farias Santos, J.C., and Goulart, M.O. (2015). Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *Int J Mol Sci* 16, 30269-30308.
- de David, C., Rodrigues, G., Bona, S., Meurer, L., Gonzalez-Gallego, J., Tunon, M.J., and Marroni, N.P. (2011). Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol Pathol* 39, 949-957.
- De Vries, N., and De Flora, S. (1993). N-acetyl-l-cysteine. *J Cell Biochem Suppl* 17F, 270-277.
- Dent, P., Fang, Y., Gupta, S., Studer, E., Mitchell, C., Spiegel, S., and Hylemon, P.B. (2005). Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes. *Hepatology* 42, 1291-1299.
- Derbyshire, E.R., and Marletta, M.A. (2012). Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem* 81, 533-559.
- Dionisio, N., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Majano, P.L., Benedicto, I., Rosado, J.A., Salido, G.M., and Gonzalez-Gallego, J. (2009). Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signalling alterations in hepatocytes. *J Hepatol* 50, 872-882.
- Dixon, P.H., and Williamson, C. (2016). The pathophysiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*.
- Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E., and Seiser, C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol* 19, 5504-5511.
- Domitrovic, R., Jakovac, H., Vasiljev Marchesi, V., Vladimir-Knezevic, S., Cvijanovic, O., Tadic, Z., Romc, Z., and Rahelic, D. (2012).

Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl<sub>4</sub>-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacol Sin* 33, 1260-1270.

- Dong, Z., Birrer, M.J., Watts, R.G., Matrisian, L.M., and Colburn, N.H. (1994). Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 609-613.
- Dong, Z., Watts, R., Sun, Y., Zhan, S., and Colburn, N. (1995). Progressive elevation of ap-1 activity during preneoplastic-to-neoplastic progression as modeled in mouse jb6 cell variants. *Int J Oncol* 7, 359-364.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., and Diederich, M. (2005). Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 223, 181-190.
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J.P., Rath, M., and Wagner, E.F. (2003). Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112, 181-192.
- Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 859-868.
- El-Mir, M.Y., Badia, M.D., Luengo, N., Monte, M.J., and Marin, J.J. (2001). Increased levels of typically fetal bile acid species in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)* 100, 499-508.
- Elliott, S.J., Meszaros, J.G., and Schilling, W.P. (1992). Effect of oxidant stress on calcium signaling in vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 13, 635-650.
- Engin, A., Dincer, S., Ercan, S.Z., Memis, L., Bukan, N., and Bozkurt, S. (2006). Regulation of fibrogenesis during the early phase of common bile duct obstruction. *ANZ J Surg* 76, 645-648.
- Ermak, G., and Davies, K.J. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* 38, 713-721.
- Eslin, D., Sankpal, U.T., Lee, C., Sutphin, R.M., Maliakal, P., Currier, E., Sholler, G., Khan, M., and Basha, R. (2013). Tolfenamic acid

inhibits neuroblastoma cell proliferation and induces apoptosis: a novel therapeutic agent for neuroblastoma. *Mol Carcinog* 52, 377-386.

- Esplugues, J.V., Rocha, M., Nunez, C., Bosca, I., Ibiza, S., Herance, J.R., Ortega, A., Serrador, J.M., D'Ocon, P., and Victor, V.M. (2006). Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants. *Circ Res* 99, 1067-1075.
- Esteban, F.J., Pedrosa, J.A., Jimenez, A., Fernandez, A.P., Bentura, M.L., Martinez-Murillo, R., Rodrigo, J., and Peinado, M.A. (1997). Distribution of neuronal nitric oxide synthase in the rat liver. *Neurosci Lett* 226, 99-102.
- Esteller, A. (2008). Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol* 14, 5641-5649.
- Estevez, A.G., Spear, N., Manuel, S.M., Radi, R., Henderson, C.E., Barbeito, L., and Beckman, J.S. (1998). Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci* 18, 923-931.
- Exton, J.H. (1988). Role of phosphoinositides in the regulation of liver function. *Hepatology* 8, 152-166.
- Fang, Y., Han, S.I., Mitchell, C., Gupta, S., Studer, E., Grant, S., Hylemon, P.B., and Dent, P. (2004). Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology* 40, 961-971.
- Fanjul, A., Dawson, M.I., Hobbs, P.D., Jong, L., Cameron, J.F., Harlev, E., Graupner, G., Lu, X.P., and Pfahl, M. (1994). A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* 372, 107-111.
- Fariss, M.W., Olafsdottir, K., and Reed, D.J. (1984). Extracellular calcium protects isolated rat hepatocytes from injury. *Biochem Biophys Res Commun* 121, 102-110.



- Farrell, G.C., Duddy, S.K., Kass, G.E., Llopis, J., Gahm, A., and Orrenius, S. (1990). Release of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum is not the mechanism for bile acid-induced cholestasis and hepatotoxicity in the intact rat liver. *J Clin Invest* 85, 1255-1259.
- Faubion, W.A., Guicciardi, M.E., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Svingen, P.A., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (1999). Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 103, 137-145.
- Ferret, P.J., Hammoud, R., Tulliez, M., Tran, A., Trebeden, H., Jaffray, P., Malassagne, B., Calmus, Y., Weill, B., and Batteux, F. (2001). Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 33, 1173-1180.
- Fickert, P., Trauner, M., Fuchsbichler, A., Zollner, G., Wagner, M., Marschall, H.U., Zatloukal, K., and Denk, H. (2005). Oncosis represents the main type of cell death in mouse models of cholestasis. *J Hepatol* 42, 378-385.
- Fiorucci, S., Antonelli, E., Morelli, O., Mencarelli, A., Casini, A., Mello, T., Palazzetti, B., Tallet, D., del Soldato, P., and Morelli, A. (2001a). NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8897-8902.
- Fiorucci, S., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Del Soldato, P., Morelli, A., and Ignarro, L.J. (2001b). An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2652-2657.
- Fischer, K.D., Haese, A., and Nowock, J. (1993). Cooperation of GATA-1 and Sp1 can result in synergistic transcriptional activation or interference. *J Biol Chem* 268, 23915-23923.
- Forestier, M., Solioz, M., Isbeki, F., Talos, C., Reichen, J., and Krahenbuhl, S. (1997). Hepatic mitochondrial proliferation in rats

with secondary biliary cirrhosis: time course and mechanisms. *Hepatology* 26, 386-391.

- Franco, M.C., and Estevez, A.G. (2014). Tyrosine nitration as mediator of cell death. *Cell Mol Life Sci* 71, 3939-3950.
- Friedman, S.L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275, 2247-2250.
- Fritsche, M., Haessler, C., and Brandner, G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8, 307-318.
- Fukui, K., Kaneda, M., Takahashi, E., Washio, M., and Doi, K. (1994). Protective effects of sulfhydryl compounds on HOCl-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> increase in single rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 26, 455-461.
- Galicia-Moreno, M., Favari, L., and Muriel, P. (2012). Antifibrotic and antioxidant effects of N-acetylcysteine in an experimental cholestatic model. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 24, 179-185.
- Gan, Y., Shen, Y.H., Wang, J., Wang, X., Utama, B., and Wang, X.L. (2005). Role of histone deacetylation in cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 280, 16467-16475.
- Gane, E.J., Weilert, F., Orr, D.W., Keogh, G.F., Gibson, M., Lockhart, M.M., Frampton, C.M., Taylor, K.M., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2010). The mitochondria-targeted anti-oxidant mitoquinone decreases liver damage in a phase II study of hepatitis C patients. *Liver Int* 30, 1019-1026.
- Garcia-Ruiz, I., Fernandez-Moreira, D., Solis-Munoz, P., Rodriguez-Juan, C., Diaz-Sanjuan, T., Munoz-Yague, T., and Solis-Herruzo, J.A. (2010). Mitochondrial complex I subunits are decreased in murine nonalcoholic fatty liver disease: implication of peroxynitrite. *J Proteome Res* 9, 2450-2459.
- Garcia-Ruiz, I., Rodriguez-Juan, C., Diaz-Sanjuan, T., del Hoyo, P., Colina, F., Munoz-Yague, T., and Solis-Herruzo, J.A. (2006). Uric acid

and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 44, 581-591.

- Garcia-Ruiz, I., Solis-Munoz, P., Fernandez-Moreira, D., Grau, M., Colina, F., Munoz-Yague, T., and Solis-Herruzo, J.A. (2014). High-fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation complexes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Dis Model Mech* 7, 1287-1296.
- Gerloff, T., Geier, A., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Matern, S., and Gattung, C. (1999). Differential expression of basolateral and canalicular organic anion transporters during regeneration of rat liver. *Gastroenterology* 117, 1408-1415.
- Gioscia-Ryan, R.A., LaRocca, T.J., Sindler, A.L., Zigler, M.C., Murphy, M.P., and Seals, D.R. (2014). Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice. *J Physiol* 592, 2549-2561.
- Girling, R., Partridge, J.F., Bandara, L.R., Burden, N., Totty, N.F., Hsuan, J.J., and La Thangue, N.B. (1993). A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature* 362, 83-87.
- Giuffre, A., Sarti, P., D'Itri, E., Buse, G., Soulimane, T., and Brunori, M. (1996). On the mechanism of inhibition of cytochrome c oxidase by nitric oxide. *J Biol Chem* 271, 33404-33408.
- Glantz, A., Marschall, H.U., Lammert, F., and Mattsson, L.A. (2005). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a randomized controlled trial comparing dexamethasone and ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 42, 1399-1405.
- Gomes, D.A., Rodrigues, M.A., Leite, M.F., Gomez, M.V., Varnai, P., Balla, T., Bennett, A.M., and Nathanson, M.H. (2008). c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem* 283, 4344-4351.
- Gomes da Silveira, V., Ribeiro Filho, J. (2013). Anatomia y fisiologia hepática.

- Gonzalez, R., Cruz, A., Ferrin, G., Lopez-Cillero, P., Fernandez-Rodriguez, R., Briceno, J., Gomez, M.A., Rufian, S., Mata Mde, L., Martinez-Ruiz, A., *et al.* (2011). Nitric oxide mimics transcriptional and post-translational regulation during alpha-tocopherol cytoprotection against glycochenodeoxycholate-induced cell death in hepatocytes. *J Hepatol* 55, 133-144.
- Gonzalez, R., Ferrin, G., Hidalgo, A.B., Ranchal, I., Lopez-Cillero, P., Santos-Gonzalez, M., Lopez-Lluch, G., Briceno, J., Gomez, M.A., Poyato, A., *et al.* (2009). N-acetylcysteine, coenzyme Q10 and superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by d-galactosamine in primary culture of human hepatocytes. *Chem Biol Interact* 181, 95-106.
- Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D.R., Zeviani, M., and Turnbull, D.M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16080.
- Graham, D., Huynh, N.N., Hamilton, C.A., Beattie, E., Smith, R.A., Cocheme, H.M., Murphy, M.P., and Dominiczak, A.F. (2009). Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy. *Hypertension* 54, 322-328.
- Grattagliano, I., Portincasa, P., Palmieri, V.O., and Palasciano, G. (2005). Contribution of canalicular glutathione efflux to bile formation. From cholestasis associated alterations to pharmacological intervention to modify bile flow. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5, 153-161.
- Green, L., and Donehower, R.C. (1984). Hepatic toxicity of low doses of mithramycin in hypercalcemia. *Cancer Treat Rep* 68, 1379-1381.
- Guerra, M.T., and Nathanson, M.H. (2015). Calcium signaling and secretion in cholangiocytes. *Pancreatology* 15, S44-48.

- Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2002). Bile acid-mediated hepatocyte apoptosis and cholestatic liver disease. *Dig Liver Dis* 34, 387-392.
- Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2005). Cholestatic hepatocellular injury: what do we know and how should we proceed. *J Hepatol* 42, 297-300.
- Gujral, J.S., Farhood, A., Bajt, M.L., and Jaeschke, H. (2003). Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology* 38, 355-363.
- Gujral, J.S., Hinson, J.A., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2004a). NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G243-252.
- Gujral, J.S., Liu, J., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2004b). Reduced oncotic necrosis in Fas receptor-deficient C57BL/6J-lpr mice after bile duct ligation. *Hepatology* 40, 998-1007.
- Gumprich, E., Dahl, R., Yerushalmi, B., Devereaux, M.W., and Sokol, R.J. (2002). Nitric oxide ameliorates hydrophobic bile acid-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes by non-mitochondrial pathways. *J Biol Chem* 277, 25823-25830.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18, 331-368.
- Hachmeister, J.E., Valluru, L., Bao, F., and Liu, D. (2006). Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin administered into the intrathecal space reduces oxidative damage and neuron death after spinal cord injury: a comparison with methylprednisolone. *J Neurotrauma* 23, 1766-1778.
- Hall, F.L., Williams, R.T., Wu, L., Wu, F., Carbonaro-Hall, D.A., Harper, J.W., and Warburton, D. (1993). Two potentially oncogenic cyclins, cyclin A and cyclin D1, share common properties of subunit

configuration, tyrosine phosphorylation and physical association with the Rb protein. *Oncogene* 8, 1377-1384.

- Hammerschmidt, S., and Wahn, H. (1998). The effect of the oxidant hypochlorous acid on the L-type calcium current in isolated ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1855-1867.
- Han, E.K., Begemann, M., Sgambato, A., Soh, J.W., Doki, Y., Xing, W.Q., Liu, W., and Weinstein, I.B. (1996). Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27kip1, inhibits growth, and enhances apoptosis. *Cell Growth Differ* 7, 699-710.
- Han, E.K., Ng, S.C., Arber, N., Begemann, M., and Weinstein, I.B. (1999). Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. *Apoptosis* 4, 213-219.
- Harada, K., Furubo, S., Ozaki, S., Hiramatsu, K., Sudo, Y., and Nakanuma, Y. (2001). Increased expression of WAF1 in intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis relates to apoptosis. *J Hepatol* 34, 500-506.
- Harrison, D.G., and Ohara, Y. (1995). Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion. *Am J Cardiol* 75, 75B-81B.
- Harrison, P.M., Wendon, J.A., Gimson, A.E., Alexander, G.J., and Williams, R. (1991). Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 324, 1852-1857.
- He, H., Mennone, A., Boyer, J.L., and Cai, S.Y. (2011). Combination of retinoic acid and ursodeoxycholic acid attenuates liver injury in bile duct-ligated rats and human hepatic cells. *Hepatology* 53, 548-557.
- Helyar, L., Bundschuh, D.S., Laskin, J.D., and Laskin, D.L. (1994). Induction of hepatic Ito cell nitric oxide production after acute endotoxemia. *Hepatology* 20, 1509-1515.

- Higuchi, H., Bronk, S.F., Takikawa, Y., Werneburg, N., Takimoto, R., El-Deiry, W., and Gores, G.J. (2001a). The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem* 276, 38610-38618.
- Higuchi, H., Bronk, S.F., Taniai, M., Canbay, A., and Gores, G.J. (2002). Cholestasis increases tumor necrosis factor-related apoptotic-inducing ligand (TRAIL)-R2/DR5 expression and sensitizes the liver to TRAIL-mediated cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 461-467.
- Higuchi, H., and Gores, G.J. (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284, G734-738.
- Higuchi, H., Grambihler, A., Canbay, A., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2004). Bile acids up-regulate death receptor 5/TRAIL-receptor 2 expression via a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway involving Sp1. *J Biol Chem* 279, 51-60.
- Higuchi, H., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Zhang, H., Dean, N., and Gores, G.J. (2001b). Bid antisense attenuates bile acid-induced apoptosis and cholestatic liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 866-873.
- Hildeman, D.A., Mitchell, T., Teague, T.K., Henson, P., Day, B.J., Kappler, J., and Marrack, P.C. (1999). Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* 10, 735-744.
- Hirano, F., Tanada, H., Makino, Y., Okamoto, K., Hiramoto, M., Handa, H., and Makino, I. (1996). Induction of the transcription factor AP-1 in cultured human colon adenocarcinoma cells following exposure to bile acids. *Carcinogenesis* 17, 427-433.
- Hirata, K., Dufour, J.F., Shibao, K., Knickelbein, R., O'Neill, A.F., Bode, H.P., Cassio, D., St-Pierre, M.V., Larusso, N.F., Leite, M.F., *et al.* (2002a). Regulation of Ca(2+) signaling in rat bile duct epithelia by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Hepatology* 36, 284-296.

- Hirata, K., Pusch, T., O'Neill, A.F., Dranoff, J.A., and Nathanson, M.H. (2002b). The type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor can trigger Ca<sup>2+</sup> waves in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 122, 1088-1100.
- Hodgson, E.K., and Fridovich, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry* 14, 5299-5303.
- Hoffmann, A., Gloe, T., and Pohl, U. (2001). Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol* 188, 33-44.
- Hofmann, A.F. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 159, 2647-2658.
- Hofmann, A.F., and Eckmann, L. (2006). How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4333-4334.
- Hofmann, A.F., and Hagey, L.R. (2008). Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65, 2461-2483.
- Holmstrom, K.M., and Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 411-421.
- Houten, S.M. (2006). Homing in on bile acid physiology. *Cell Metab* 4, 423-424.
- Hu, Q., Corda, S., Zweier, J.L., Capogrossi, M.C., and Ziegelstein, R.C. (1998). Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation* 97, 268-275.
- Huang, C., Ma, W.Y., Dawson, M.I., Rincon, M., Flavell, R.A., and Dong, Z. (1997a). Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5826-5830.



- Huang, M.T., Newmark, H.L., and Frenkel, K. (1997b). Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J Cell Biochem Suppl* 27, 26-34.
- Huang, Y.T., Hsu, Y.C., Chen, C.J., Liu, C.T., and Wei, Y.H. (2003). Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci* 10, 170-178.
- Hunter, T., and Pines, J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79, 573-582.
- Hurshman, A.R., and Marletta, M.A. (1995). Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity. *Biochemistry* 34, 5627-5634.
- Ishikawa, Y., and Kitamura, M. (2000). Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int* 58, 1078-1087.
- Ishimura, N., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2004). Inducible nitric oxide synthase upregulates cyclooxygenase-2 in mouse cholangiocytes promoting cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G88-95.
- Ito, Y., Bethea, N.W., Baker, G.L., McCuskey, M.K., Urbaschek, R., and McCuskey, R.S. (2003). Hepatic microcirculatory dysfunction during cholestatic liver injury in rats. *Microcirculation* 10, 421-432.
- Iwakiri, Y., and Kim, M.Y. (2015). Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol Sci* 36, 524-536.
- Jacquemin, E. (2001). Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis* 21, 551-562.
- Jaeschke, H. (1995). Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 209, 104-111.
- Jaeschke, H. (2006). Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G1083-1088.

- Jaeschke, H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1, 173-179.
- Jaeschke, H., Fisher, M.A., Lawson, J.A., Simmons, C.A., Farhood, A., and Jones, D.A. (1998). Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF-alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol* 160, 3480-3486.
- James, A.M., Cocheme, H.M., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2005). Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species. Implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools. *J Biol Chem* 280, 21295-21312.
- Jazrawi, R.P., de Caestecker, J.S., Goggin, P.M., Britten, A.J., Joseph, A.E., Maxwell, J.D., and Northfield, T.C. (1994). Kinetics of hepatic bile acid handling in cholestatic liver disease: effect of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 106, 134-142.
- Jia, Z., Gao, Y., Wang, L., Li, Q., Zhang, J., Le, X., Wei, D., Yao, J.C., Chang, D.Z., Huang, S., *et al.* (2010). Combined treatment of pancreatic cancer with mithramycin A and tolfenamic acid promotes Sp1 degradation and synergistic antitumor activity. *Cancer Res* 70, 1111-1119.
- Jin, S.W., Choi, C.Y., Hwang, Y.P., Kim, H.G., Kim, S.J., Chung, Y.C., Lee, K.J., Jeong, T.C., and Jeong, H.G. (2016). Betulinic Acid Increases eNOS Phosphorylation and NO Synthesis via the Calcium-Signaling Pathway. *J Agric Food Chem* 64, 785-791.
- Jones, B.A., Rao, Y.P., Stravitz, R.T., and Gores, G.J. (1997). Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *Am J Physiol* 272, G1109-1115.
- Jones, B.B., and Petkovich, M. (1996). Targeting Transcription through Nuclear Receptors. *Curr Pharm Des* 2, 155-168.

- Kahl, C.R., and Means, A.R. (2003). Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24, 719-736.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649-661.
- Kang, Q., and Chen, A. (2009). Curcumin inhibits srebp-2 expression in activated hepatic stellate cells in vitro by reducing the activity of specificity protein-1. *Endocrinology* 150, 5384-5394.
- Kanno, N., LeSage, G., Glaser, S., and Alpini, G. (2001). Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G612-625.
- Kaplan, M.M. (1996). Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 335, 1570-1580.
- Karantzoulis-Fegaras, F., Antoniou, H., Lai, S.L., Kulkarni, G., D'Abreo, C., Wong, G.K., Miller, T.L., Chan, Y., Atkins, J., Wang, Y., *et al.* (1999). Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem* 274, 3076-3093.
- Karlsen, T.H., Vesterhus, M., and Boberg, K.M. (2014). Review article: controversies in the management of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther* 39, 282-301.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., *et al.* (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278, 9435-9440.
- Kelso, G.F., Porteous, C.M., Coulter, C.V., Hughes, G., Porteous, W.K., Ledgerwood, E.C., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2001). Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem* 276, 4588-4596.

- Kida, T., Tsubosaka, Y., Hori, M., Ozaki, H., and Murata, T. (2013). Bile acid receptor TGR5 agonism induces NO production and reduces monocyte adhesion in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1663-1669.
- Kim, Y.H., Lee, D.H., Jeong, J.H., Guo, Z.S., and Lee, Y.J. (2008). Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochem Pharmacol* 75, 1946-1958.
- Kitada, T., Seki, S., Iwai, S., Yamada, T., Sakaguchi, H., and Wakasa, K. (2001). In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. *J Hepatol* 35, 613-618.
- Kleinert, H., Wallerath, T., Fritz, G., Ihrig-Biedert, I., Rodriguez-Pascual, F., Geller, D.A., and Forstermann, U. (1998). Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br J Pharmacol* 125, 193-201.
- Koller, C.A., and Miller, D.M. (1986). Preliminary observations on the therapy of the myeloid blast phase of chronic granulocytic leukemia with plicamycin and hydroxyurea. *N Engl J Med* 315, 1433-1438.
- Konduri, S., Colon, J., Baker, C.H., Safe, S., Abbruzzese, J.L., Abudayyeh, A., Basha, M.R., and Abdelrahim, M. (2009). Tolfenamic acid enhances pancreatic cancer cell and tumor response to radiation therapy by inhibiting survivin protein expression. *Mol Cancer Ther* 8, 533-542.
- Krahenbuhl, S., Krahenbuhl-Glauser, S., Stucki, J., Gehr, P., and Reichen, J. (1992). Stereological and functional analysis of liver mitochondria from rats with secondary biliary cirrhosis: impaired mitochondrial metabolism and increased mitochondrial content per hepatocyte. *Hepatology* 15, 1167-1172.

- Krahenbuhl, S., Talos, C., Fischer, S., and Reichen, J. (1994). Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19, 471-479.
- Krahenbuhl, S., Talos, C., Lauterburg, B.H., and Reichen, J. (1995). Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 22, 607-612.
- Kruglov, E.A., Gautam, S., Guerra, M.T., and Nathanson, M.H. (2011). Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates bile salt export pump activity in rat hepatocytes. *Hepatology* 54, 1790-1799.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kubitz, R., Saha, N., Kuhlkamp, T., Dutta, S., vom Dahl, S., Wettstein, M., and Haussinger, D. (2004). Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* 279, 10323-10330.
- Kumar, S., Sun, X., Wedgwood, S., and Black, S.M. (2008). Hydrogen peroxide decreases endothelial nitric oxide synthase promoter activity through the inhibition of AP-1 activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L370-377.
- Kumar, S., Sun, X., Wiseman, D.A., Tian, J., Umapathy, N.S., Verin, A.D., and Black, S.M. (2009). Hydrogen peroxide decreases endothelial nitric oxide synthase promoter activity through the inhibition of Sp1 activity. *DNA Cell Biol* 28, 119-129.
- Kumar, S., Wedgwood, S., and Black, S.M. (2007). Nordihydroguaiaretic acid increases endothelial nitric oxide synthase expression via the transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol* 26, 853-862.
- Lam, P., Cheung, F., Tan, H.Y., Wang, N., Yuen, M.F., and Feng, Y. (2016). Hepatoprotective Effects of Chinese Medicinal Herbs: A Focus on Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activities. *Int J Mol Sci* 17, 465.

- Lammert, F., Marschall, H.U., Glantz, A., and Matern, S. (2000). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *J Hepatol* 33, 1012-1021.
- Lazaridis, K.N., Gores, G.J., and Lindor, K.D. (2001). Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J Hepatol* 35, 134-146.
- Lecointe, N., Bernard, O., Naert, K., Joulin, V., Larsen, C.J., Romeo, P.H., and Mathieu-Mahul, D. (1994). GATA-and SP1-binding sites are required for the full activity of the tissue-specific promoter of the tal-1 gene. *Oncogene* 9, 2623-2632.
- Lecureur, V., Courtois, A., Payen, L., Verhnet, L., Guillouzo, A., and Fardel, O. (2000). Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters. *Toxicology* 153, 203-219.
- Lee, H.C., and Wei, Y.H. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 822-834.
- Lee, H.Y., Kim, S.W., Lee, G.H., Choi, M.K., Jung, H.W., Kim, Y.J., Kwon, H.J., and Chae, H.J. (2016). Turmeric extract and its active compound, curcumin, protect against chronic CCl<sub>4</sub>-induced liver damage by enhancing antioxidation. *BMC Complement Altern Med* 16, 316.
- Lee, T.K., Hammond, C.L., and Ballatori, N. (2001). Intracellular glutathione regulates taurocholate transport in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 174, 207-215.
- Leise, M.D., Poterucha, J.J., and Talwalkar, J.A. (2014). Drug-induced liver injury. *Mayo Clin Proc* 89, 95-106.
- Lemonnier, F., Cresteil, D., Feneant, M., Couturier, M., Bernard, O., and Alagille, D. (1987). Plasma lipid peroxides in cholestatic children. *Acta Paediatr Scand* 76, 928-934.
- Leung, T.M., Tipoe, G.L., Liong, E.C., Lau, T.Y., Fung, M.L., and Nanji, A.A. (2008). Endothelial nitric oxide synthase is a critical factor in experimental liver fibrosis. *Int J Exp Pathol* 89, 241-250.

- Li, C., Fox, C.J., Master, S.R., Bindokas, V.P., Chodosh, L.A., and Thompson, C.B. (2002). Bcl-X(L) affects Ca(2+) homeostasis by altering expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9830-9835.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, J.J., Dong, Z., Dawson, M.I., and Colburn, N.H. (1996). Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res* 56, 483-489.
- Li, T., and Apte, U. (2015). Bile Acid Metabolism and Signaling in Cholestasis, Inflammation, and Cancer. *Adv Pharmacol* 74, 263-302.
- Li, X., Dai, Y., Yan, S., Shi, Y., Li, J., Liu, J., Cha, L., and Mu, J. (2016). Resveratrol lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via calcium-dependent endothelial NO production. *Clin Exp Hypertens* 38, 287-293.
- Liang, S., Su, W.W., Wang, Y.G., Peng, W., Nie, Y.C., and Li, P.B. (2013). Effect of quercetin 7-rhamnoside on glycochenodeoxycholic acid-induced L-02 human normal liver cell apoptosis. *Int J Mol Med* 32, 323-330.
- Liang, Z., Xie, W., Wu, R., Geng, H., Zhao, L., Xie, C., Li, X., Zhu, M., Zhu, W., Zhu, J., *et al.* (2015). Inhibition of tobacco smoke-induced bladder MAPK activation and epithelial-mesenchymal transition in mice by curcumin. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 4503-4513.
- Lin, S.Y., Wang, Y.Y., Chen, W.Y., Chuang, Y.H., Pan, P.H., and Chen, C.J. (2014). Beneficial effect of quercetin on cholestatic liver injury. *J Nutr Biochem* 25, 1183-1195.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25, 402-408.

- Liver, E.A.f.t.S.o.t. (2009). EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 51, 237-267.
- Lopez-Sanchez, L.M., Corrales, F.J., Barcos, M., Espejo, I., Munoz-Castaneda, J.R., and Rodriguez-Ariza, A. (2010). Inhibition of nitric oxide synthesis during induced cholestasis ameliorates hepatocellular injury by facilitating S-nitrosothiol homeostasis. *Lab Invest* 90, 116-127.
- Lopez, P. (2014). Morphological Issues of Drug Induced Liver Disease. In *Continued education in hepatopathology*, pp. 439-450.
- Lowenstein, C.J., and Padalko, E. (2004). iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci* 117, 2865-2867.
- Lowes, D.A., Thottakam, B.M., Webster, N.R., Murphy, M.P., and Galley, H.F. (2008). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide-peptidoglycan model of sepsis. *Free Radic Biol Med* 45, 1559-1565.
- Lu, Y.P., Chang, R.L., Lou, Y.R., Huang, M.T., Newmark, H.L., Reuhl, K.R., and Conney, A.H. (1994). Effect of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of c-Jun and c-Fos in JB6 cells and in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 15, 2363-2370.
- Lubrano, R., Frediani, T., Citti, G., Cardi, E., Mannarino, O., Elli, M., Cozzi, F., and Giardini, O. (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation before and after vitamin E supplementation in children with cholestasis. *J Pediatr* 115, 380-384.
- Ludwig, J. (1998). Idiopathic adulthood ductopenia: an update. *Mayo Clin Proc* 73, 285-291.
- Madesh, M., Hawkins, B.J., Milovanova, T., Bhanumathy, C.D., Joseph, S.K., Ramachandrarao, S.P., Sharma, K., Kurosaki, T., and Fisher, A.B. (2005). Selective role for superoxide in InsP3 receptor-mediated mitochondrial dysfunction and endothelial apoptosis. *J Cell Biol* 170, 1079-1090.



- Maggs, J.R., and Chapman, R.W. (2008). An update on primary sclerosing cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol* 24, 377-383.
- Maillette de Buy Wenniger, L., and Beuers, U. (2010). Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis* 42, 409-418.
- Malarkey, D.E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., and Maronpot, R.R. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 33, 27-34.
- Malassagne, B., Ferret, P.J., Hammoud, R., Tulliez, M., Bedda, S., Trebeden, H., Jaffray, P., Calmus, Y., Weill, B., and Batteux, F. (2001). The superoxide dismutase mimetic MnTBAP prevents Fas-induced acute liver failure in the mouse. *Gastroenterology* 121, 1451-1459.
- Malhi, H., Gores, G.J., and Lemasters, J.J. (2006). Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 43, S31-44.
- Malhi, H., Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2010). Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev* 90, 1165-1194.
- Marchi, S., and Pinton, P. (2016). Alterations of calcium homeostasis in cancer cells. *Curr Opin Pharmacol* 29, 1-6.
- Marin, J., Encabo, A., Briones, A., Garcia-Cohen, E.C., and Alonso, M.J. (1999). Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* 64, 279-303.
- Marsden, P.A., Heng, H.H., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X.M., Tsui, L.C., and Schappert, K.T. (1993). Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268, 17478-17488.
- Martinefski, M.R., Contin, M.D., Rodriguez, M.R., Gerez, E.M., Galleano, M.L., Lucangioli, S.E., Bianciotti, L.G., and Tripodi, V.P. (2014). Coenzyme Q in pregnant women and rats with intrahepatic cholestasis. *Liver Int* 34, 1040-1048.
- Marzioni, M., Francis, H., Benedetti, A., Ueno, Y., Fava, G., Venter, J., Reichenbach, R., Mancino, M.G., Summers, R., Alpini, G., *et al.*

- (2006). Ca<sup>2+</sup>-dependent cytoprotective effects of ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts. *Am J Pathol* 168, 398-409.
- McCubrey, J.A., Lahair, M.M., and Franklin, R.A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 8, 1775-1789.
  - McIntyre, N. (1999). Cholestasis. In *Oxford textbook of Clinical Hepatology*, B.J.-P. Bircher J, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J, ed. (Oxford textbook of Clinical Hepatology.), pp. p. 1574-1579.
  - McNaughton, L., Puttagunta, L., Martinez-Cuesta, M.A., Kneteman, N., Mayers, I., Moqbel, R., Hamid, Q., and Radomski, M.W. (2002). Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17161-17166.
  - Mei, Y., and Thevananther, S. (2011). Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 54, 1777-1789.
  - Meier, P.J. (1988). Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 8, 293-307.
  - Meier, P.J., and Stieger, B. (2002). Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64, 635-661.
  - Melgert, B.N., Olinga, P., Van Der Laan, J.M., Weert, B., Cho, J., Schuppan, D., Groothuis, G.M., Meijer, D.K., and Poelstra, K. (2001). Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats. *Hepatology* 34, 719-728.
  - Melov, S., Schneider, J.A., Day, B.J., Hinerfeld, D., Coskun, P., Mirra, S.S., Crapo, J.D., and Wallace, D.C. (1998). A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 18, 159-163.
  - Meng, D., Shi, X., Jiang, B.H., and Fang, J. (2007). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induces epidermal growth factor receptor transactivation and cell proliferation through reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 42, 1651-1660.

- Meng, L., Quezada, M., Levine, P., Han, Y., McDaniel, K., Zhou, T., Lin, E., Glaser, S., Meng, F., Francis, H., *et al.* (2015). Functional role of cellular senescence in biliary injury. *Am J Pathol* 185, 602-609.
- Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14, 2077-2086.
- Milkiewicz, M., Kopycinska, J., Kempinska-Podhorodecka, A., Haas, T., Bogdanos, D.P., Elias, E., and Milkiewicz, P. (2014). Ursodeoxycholic acid influences the expression of p27kip1 but not FoxO1 in patients with non-cirrhotic primary biliary cirrhosis. *J Immunol Res* 2014, 921285.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., and Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 8, 95-108.
- Min, J., Jin, Y.M., Moon, J.S., Sung, M.S., Jo, S.A., and Jo, I. (2006). Hypoxia-induced endothelial NO synthase gene transcriptional activation is mediated through the tax-responsive element in endothelial cells. *Hypertension* 47, 1189-1196.
- Mitsuyama, T., Hidaka, K., Furuno, T., and Hara, N. (1998). Release of nitric oxide and expression of constitutive nitric oxide synthase of human endothelial cells: enhancement by a 14-membered ring macrolide. *Mol Cell Biochem* 181, 157-161.
- Mitsuyama, T., Tanaka, T., Hidaka, K., Abe, M., and Hara, N. (1995). Inhibition by erythromycin of superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes through the action of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Respiration* 62, 269-273.
- Mittnacht, S., Lees, J.A., Desai, D., Harlow, E., Morgan, D.O., and Weinberg, R.A. (1994). Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation. *EMBO J* 13, 118-127.
- Miyahara, K., Kawamoto, T., Sase, K., Yui, Y., Toda, K., Yang, L.X., Hattori, R., Aoyama, T., Yamamoto, Y., Doi, Y., *et al.* (1994). Cloning

and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem* 223, 719-726.

- Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P.J., Burgart, L.J., and Gores, G.J. (1999). Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 117, 669-677.
- Montano Loza, A.J., and Angulo, P. (2007). [Auto-antibodies in liver disease]. *Rev Gastroenterol Mex* 72, 62-68.
- Monte, M.J., Marin, J.J., Antelo, A., and Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15, 804-816.
- Montrone, M., Martorelli, D., Rosato, A., and Dolcetti, R. (2009). Retinoids as critical modulators of immune functions: new therapeutic perspectives for old compounds. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9, 113-131.
- Moussa, Y.I., Plevris, J.N., and Hayes, P.C. (2000). Plasma nitrites/nitrates in HCV infection and hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12, 159-163.
- Mukhopadhyay, P., Horvath, B., Zsengeller, Z., Batkai, S., Cao, Z., Kechrid, M., Holovac, E., Erdelyi, K., Tanchian, G., Liaudet, L., *et al.* (2012). Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants. *Free Radic Biol Med* 53, 1123-1138.
- Muntane, J., De la Rosa, A.J., Marin, L.M., and Padillo, F.J. (2013). Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. *Mitochondrion* 13, 257-262.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.
- Murray, F., Bell, D., Kelso, E.J., Millar, B.C., and McDermott, B.J. (2001). Positive and negative contractile effects of somatostatin-14 on rat ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 37, 324-332.

- Musonda, C.A., and Chipman, J.K. (1998). Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 19, 1583-1589.
- Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 40, 1-6.
- Nathanson, M.H., and Boyer, J.L. (1991). Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14, 551-566.
- Nathanson, M.H., Burgstahler, A.D., Masyuk, A., and Larusso, N.F. (2001). Stimulation of ATP secretion in the liver by therapeutic bile acids. *Biochem J* 358, 1-5.
- Nathanson, M.H., Gautam, A., Bruck, R., Isales, C.M., and Boyer, J.L. (1992a). Effects of Ca<sup>2+</sup> agonists on cytosolic Ca<sup>2+</sup> in isolated hepatocytes and on bile secretion in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 15, 107-116.
- Nathanson, M.H., Gautam, A., Ng, O.C., Bruck, R., and Boyer, J.L. (1992b). Hormonal regulation of paracellular permeability in isolated rat hepatocyte couplets. *Am J Physiol* 262, G1079-1086.
- Navarro-Antolin, J., Rey-Campos, J., and Lamas, S. (2000). Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene by cyclosporine A. A role for activator protein-1. *J Biol Chem* 275, 3075-3080.
- Neumann, P., Gertzberg, N., and Johnson, A. (2004). TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L452-459.
- Nguyen, K.D., Sundaram, V., and Ayoub, W.S. (2014). Atypical causes of cholestasis. *World J Gastroenterol* 20, 9418-9426.
- Nicotera, P., and Orrenius, S. (1998). The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23, 173-180.
- Nishigaki, Y., Ohnishi, H., Moriwaki, H., and Muto, Y. (1996). Ursodeoxycholic acid corrects defective natural killer activity by

inhibiting prostaglandin E2 production in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 41, 1487-1493.

- Nunez, L.E., Nybo, S.E., Gonzalez-Sabin, J., Perez, M., Menendez, N., Brana, A.F., Shaaban, K.A., He, M., Moris, F., Salas, J.A., *et al.* (2012). A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J Med Chem* 55, 5813-5825.
- Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 105-110.
- Oh, S.H., Hatch, H.M., and Petersen, B.E. (2002). Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 13, 405-409.
- Omenetti, A., Porrello, A., Jung, Y., Yang, L., Popov, Y., Choi, S.S., Witek, R.P., Alpini, G., Venter, J., Vandongen, H.M., *et al.* (2008). Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 118, 3331-3342.
- Orrenius, S., McConkey, D.J., Nicotera, P. (1988). Mechanisms of oxidant-induced cell damage, in *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology* (New York.).
- Ozdil, B., Cosar, A., Akkiz, H., Sandikci, M., and Kece, C. (2011). New therapeutic option with N-acetylcysteine for primary sclerosing cholangitis: two case reports. *Am J Ther* 18, e71-74.
- Ozdil, B., Kece, C., Cosar, A., Akkiz, H., and Sandikci, M. (2010). Potential benefits of combined N-acetylcysteine and ciprofloxacin therapy in partial biliary obstruction. *J Clin Pharmacol* 50, 1414-1419.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., and Ruggiero, F.M. (2004). Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res* 94, 53-59.
- Pares, A. (2011). [Primary sclerosing cholangitis: diagnosis, prognosis and treatment]. *Gastroenterol Hepatol* 34, 41-52.
- Park, S.H., Lim, J.S., and Jang, K.L. (2011). All-trans retinoic acid induces cellular senescence via upregulation of p16, p21, and p27. *Cancer Lett* 310, 232-239.
- Park, Y.C., Jun, C.D., Kang, H.S., Kim, H.D., Kim, H.M., and Chung, H.T. (1996). Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology* 87, 296-302.
- Parola, M., Leonarduzzi, G., Robino, G., Albano, E., Poli, G., and Dianzani, M.U. (1996a). On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 20, 351-359.
- Parola, M., Pinzani, M., Casini, A., Leonarduzzi, G., Marra, F., Caligiuri, A., Ceni, E., Biondi, P., Poli, G., and Dianzani, M.U. (1996b). Induction of procollagen type I gene expression and synthesis in human hepatic stellate cells by 4-hydroxy-2,3-nonenal and other 4-hydroxy-2,3-alkenals is related to their molecular structure. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 261-264.
- Pascale, R., Daino, L., Garcea, R., Frassetto, S., Ruggiu, M.E., Vannini, M.G., Cozzolino, P., and Feo, F. (1989). Inhibition by ethanol of rat liver plasma membrane (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase: protective effect of S-adenosyl-L-methionine, L-methionine, and N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 97, 216-229.
- Pastor, A., Collado, P.S., Almar, M., and Gonzalez-Gallego, J. (1997). Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* 27, 363-370.

- Patel, M., and Day, B.J. (1999). Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol Sci* 20, 359-364.
- Patel, T., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (1994). Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 94, 2183-2192.
- Peng, T.I., and Jou, M.J. (2010). Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 183-188.
- Pentikainen, P.J., Tokola, O., Alhava, E., and Penttila, A. (1984). Pharmacokinetics of tolfenamic acid: disposition in bile, blood and urine after intravenous administration to man. *Eur J Clin Pharmacol* 27, 349-354.
- Pereira-Filho, G., Ferreira, C., Schwengber, A., Marroni, C., Zettler, C., and Marroni, N. (2008). Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol* 45, 156-162.
- Peres, W., Tunon, M.J., Collado, P.S., Herrmann, S., Marroni, N., and Gonzalez-Gallego, J. (2000). The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 33, 742-750.
- Perez, M.J., and Briz, O. (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 15, 1677-1689.
- Pfahl, M., Apfel, R., Bendik, I., Fanjul, A., Graupner, G., Lee, M.O., La-Vista, N., Lu, X.P., Piedrafita, J., Ortiz, M.A., *et al.* (1994). Nuclear retinoid receptors and their mechanism of action. *Vitam Horm* 49, 327-382.
- Piazza, M., Dieckmann, T., and Guillemette, J.G. (2016). Structural Studies of a Complex Between Endothelial Nitric Oxide Synthase and Calmodulin at Physiological Calcium Concentration. *Biochemistry*.
- Pinon, V.P., Millot, G., Munier, A., Vassy, J., Linares-Cruz, G., Capeau, J., Calvo, F., and Lacombe, M.L. (1999). Cytoskeletal association of the A and B nucleoside diphosphate kinases of interphasic but not mitotic human carcinoma cell lines: specific nuclear localization of the B subunit. *Exp Cell Res* 246, 355-367.



- Podevin, P., Calmus, Y., Bonnefis, M.T., Veyrunes, C., Chereau, C., and Poupon, R. (1995). Effect of cholestasis and bile acids on interferon-induced 2',5'-adenylate synthetase and NK cell activities. *Gastroenterology* 108, 1192-1198.
- Portincasa, P., Grattagliano, I., Testini, M., Caruso, M.L., Wang, D.Q., Moschetta, A., Calamita, G., Vacca, M., Valentini, A.M., Renna, G., *et al.* (2007). Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 42, 1381-1391.
- Poupon, R., Chazouilleres, O., and Poupon, R.E. (2000). Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol* 32, 129-140.
- Pusl, T., and Nathanson, M.H. (2004). The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the regulation of bile secretion in health and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1318-1325.
- Pusl, T., Vennegeerts, T., Wimmer, R., Denk, G.U., Beuers, U., and Rust, C. (2008). Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 208-212.
- Qiao, L., Han, S.I., Fang, Y., Park, J.S., Gupta, S., Gilfor, D., Amorino, G., Valerie, K., Sealy, L., Engelhardt, J.F., *et al.* (2003). Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol* 23, 3052-3066.
- Ramasamy, S., Drummond, G.R., Ahn, J., Storek, M., Pohl, J., Parthasarathy, S., and Harrison, D.G. (1999). Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol Pharmacol* 56, 116-123.
- Ramasamy, U., Anwer, M.S., and Schonhoff, C.M. (2013). Cysteine 96 of Ntcp is responsible for NO-mediated inhibition of taurocholate uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G513-519.

- Reed, D.J., Pascoe, G.A., and Thomas, C.E. (1990). Extracellular calcium effects on cell viability and thiol homeostasis. *Environ Health Perspect* 84, 113-120.
- Remsing, L.L., Bahadori, H.R., Carbone, G.M., McGuffie, E.M., Catapano, C.V., and Rohr, J. (2003). Inhibition of c-src transcription by mithramycin: structure-activity relationships of biosynthetically produced mithramycin analogues using the c-src promoter as target. *Biochemistry* 42, 8313-8324.
- Reshef, R., Sbeit, W., and Lachter, J. (2002). The chronic cholestasis enigma in adults. *Isr Med Assoc J* 4, 449-453.
- Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., Vergara, P., Moreno, M.G., and Muriel, P. (2008). Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl<sub>4</sub> in rats: role of TGF-beta modulation and oxidative stress. *Fundam Clin Pharmacol* 22, 417-427.
- Rizzuto, R., Bernardi, P., and Pozzan, T. (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529 Pt 1, 37-47.
- Rockey, D.C., and Chung, J.J. (1996). Regulation of inducible nitric oxide synthase in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Am J Physiol* 271, G260-267.
- Rockey, D.C., Chung, J.J., McKee, C.M., and Noble, P.W. (1998). Stimulation of inducible nitric oxide synthase in rat liver by hyaluronan fragments. *Hepatology* 27, 86-92.
- Rodrigues, C.M., Fan, G., Ma, X., Kren, B.T., and Steer, C.J. (1998a). A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 101, 2790-2799.
- Rodrigues, C.M., Fan, G., Wong, P.Y., Kren, B.T., and Steer, C.J. (1998b). Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 4, 165-178.

- Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., Andrade, V.A., Leite, M.F., and Nathanson, M.H. (2008). Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 48, 1621-1631.
- Rodriguez-Ortigosa, C.M., Celay, J., Olivas, I., Juanarena, N., Arcelus, S., Uriarte, I., Marin, J.J., Avila, M.A., Medina, J.F., and Prieto, J. (2014). A GAPDH-mediated trans-nitrosylation pathway is required for feedback inhibition of bile salt synthesis in rat liver. *Gastroenterology* 147, 1084-1093.
- Roger, L., St Pyrek, J., Little, J.M., and Adcock, E.W. (1983). What is meant by the term "bile acid"? *Am J Physiol* 244, G107-110.
- Rolo, A.P., Oliveira, P.J., Moreno, A.J., and Palmeira, C.M. (2000). Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy. *Toxicol Sci* 57, 177-185.
- Roma, M.G., Toledo, F.D., Boaglio, A.C., Basiglio, C.L., Crocenzi, F.A., and Sanchez Pozzi, E.J. (2011). Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci (Lond)* 121, 523-544.
- Rosado, J.A., Redondo, P.C., Salido, G.M., and Pariente, J.A. (2006). Calcium signalling and reactive oxygen species in non-excitabile cells. *Mini Rev Med Chem* 6, 409-415.
- Rosen, G.M., Pou, S., Ramos, C.L., Cohen, M.S., and Britigan, B.E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 9, 200-209.
- Roskams, T., and Desmet, V. (1998). Ductular reaction and its diagnostic significance. *Semin Diagn Pathol* 15, 259-269.
- Saito, M., Kohara, M., and Tsukiyama-Kohara, K. (2012). Hepatitis C virus promotes expression of the 3beta-hydroxysterol delta24-reductase through Sp1. *J Med Virol* 84, 733-746.
- Sanchez-Valle, V., Chavez-Tapia, N.C., Uribe, M., and Mendez-Sanchez, N. (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem* 19, 4850-4860.
- Sankpal, U.T., Abdelrahim, M., Connelly, S.F., Lee, C.M., Madero-Visbal, R., Colon, J., Smith, J., Safe, S., Maliakal, P., and Basha, R.

- (2012). Small molecule tolfenamic acid inhibits PC-3 cell proliferation and invasion in vitro, and tumor growth in orthotopic mouse model for prostate cancer. *Prostate* 72, 1648-1658.
- Santella, L., and Carafoli, E. (1997). Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J* 11, 1091-1109.
  - Schadt, H.S., Wolf, A., Pognan, F., Chibout, S.D., Merz, M., and Kullak-Ublick, G.A. (2016). Bile acids in drug induced liver injury: Key players and surrogate markers. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*.
  - Schanne, F.A., Kane, A.B., Young, E.E., and Farber, J.L. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206, 700-702.
  - Schmidt, H.H., Lohmann, S.M., and Walter, U. (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178, 153-175.
  - Schmidt, H.H., and Walter, U. (1994). NO at work. *Cell* 78, 919-925.
  - Schoemaker, M.H., Gommans, W.M., Conde de la Rosa, L., Homan, M., Klok, P., Trautwein, C., van Goor, H., Poelstra, K., Haisma, H.J., Jansen, P.L., *et al.* (2003). Resistance of rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis in cholestatic liver injury is due to nuclear factor-kappa B activation. *J Hepatol* 39, 153-161.
  - Scholmerich, J., Becher, M.S., Schmidt, K., Schubert, R., Kremer, B., Feldhaus, S., and Gerok, W. (1984). Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties--studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. *Hepatology* 4, 661-666.
  - Serviddio, G., Pereda, J., Pallardo, F.V., Carretero, J., Borrás, C., Cutrin, J., Vendemiale, G., Poli, G., Vina, J., and Sastre, J. (2004). Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* 39, 711-720.
  - Shah, V., Cao, S., Hendrickson, H., Yao, J., and Katusic, Z.S. (2001). Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct

ligation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G1209-1216.

- Shah, V., Toruner, M., Haddad, F., Cadelina, G., Papapetropoulos, A., Choo, K., Sessa, W.C., and Groszmann, R.J. (1999). Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 117, 1222-1228.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390-2400.
- Sherlock, S., Heathcote, J. (1999). Primary biliary cirrhosis. In textbook of Clinical Hepatology pp. p. 1090-1098.
- Sherr, C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Shibao, K., Hirata, K., Robert, M.E., and Nathanson, M.H. (2003). Loss of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors from bile duct epithelia is a common event in cholestasis. *Gastroenterology* 125, 1175-1187.
- Shimoda, S., and Tanaka, A. (2016). It is time to change primary biliary cirrhosis (PBC): New nomenclature from "cirrhosis" to "cholangitis", and upcoming treatment based on unveiling pathology. *Hepatol Res* 46, 407-415.
- Singh, S., Shackleton, G., Ah-Sing, E., Chakraborty, J., and Bailey, M.E. (1992). Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 103, 1625-1629.
- Sleiman, S.F., Langley, B.C., Basso, M., Berlin, J., Xia, L., Payappilly, J.B., Kharel, M.K., Guo, H., Marsh, J.L., Thompson, L.M., *et al.* (2011). Mithramycin is a gene-selective Sp1 inhibitor that identifies a biological intersection between cancer and neurodegeneration. *J Neurosci* 31, 6858-6870.
- Smith, M.T., and Sandy, M.S. (1985). Role of extracellular Ca<sup>2+</sup> in toxic liver injury: comparative studies with the perfused rat liver and isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 81, 213-219.

- Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2010). Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 96-103.
- Snyder, R.C., Ray, R., Blume, S., and Miller, D.M. (1991). Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters. *Biochemistry* 30, 4290-4297.
- Sodeman, T., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Miyoshi, H., and Gores, G.J. (2000). Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G992-999.
- Sofer-Levi, Y., and Resnitzky, D. (1996). Apoptosis induced by ectopic expression of cyclin D1 but not cyclin E. *Oncogene* 13, 2431-2437.
- Sokol, R.J., Devereaux, M., Khandwala, R., and O'Brien, K. (1993). Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 17, 869-881.
- Sokol, R.J., Heubi, J.E., McGraw, C., and Balistreri, W.F. (1986). Correction of vitamin E deficiency in children with chronic cholestasis. II. Effect on gastrointestinal and hepatic function. *Hepatology* 6, 1263-1269.
- Sokol, R.J., Straka, M.S., Dahl, R., Devereaux, M.W., Yerushalmi, B., Gumprich, E., Elkins, N., and Everson, G. (2001). Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr Res* 49, 519-531.
- Sokol, R.J., Winklhofer-Roob, B.M., Devereaux, M.W., and McKim, J.M., Jr. (1995). Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109, 1249-1256.
- Song, J., Ugai, H., Nakata-Tsutsui, H., Kishikawa, S., Suzuki, E., Murata, T., and Yokoyama, K.K. (2003). Transcriptional regulation by zinc-finger proteins Sp1 and MAZ involves interactions with the same cis-elements. *Int J Mol Med* 11, 547-553.

- Song, J., Ugai, H., Ogawa, K., Wang, Y., Sarai, A., Obata, Y., Kanazawa, I., Sun, K., Itakura, K., and Yokoyama, K.K. (2001). Two consecutive zinc fingers in Sp1 and in MAZ are essential for interactions with cis-elements. *J Biol Chem* 276, 30429-30434.
- Sowa, Y., Orita, T., Minamikawa, S., Nakano, K., Mizuno, T., Nomura, H., and Sakai, T. (1997). Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 142-150.
- Spirli, C., Fabris, L., Duner, E., Fiorotto, R., Ballardini, G., Roskams, T., Larusso, N.F., Sonzogni, A., Okolicsanyi, L., and Strazzabosco, M. (2003). Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits adenylyl cyclase and cAMP-dependent secretion in cholangiocytes. *Gastroenterology* 124, 737-753.
- Spivey, J.R., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (1993). Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J Clin Invest* 92, 17-24.
- Stacey, N.H., and Klaassen, C.D. (1982). Lack of protection against chemically induced injury to isolated hepatocytes by omission of calcium from the incubation medium. *J Toxicol Environ Health* 9, 267-276.
- Steinhardt, R.A., and Alderton, J. (1988). Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. *Nature* 332, 364-366.
- Stuehr, D.J., Santolini, J., Wang, Z.Q., Wei, C.C., and Adak, S. (2004). Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* 279, 36167-36170.
- Szabo, C., Day, B.J., and Salzman, A.L. (1996). Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide

dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* 381, 82-86.

- Tagliacozzi, D., Mozzi, A.F., Casetta, B., Bertucci, P., Bernardini, S., Di Ilio, C., Urbani, A., and Federici, G. (2003). Quantitative analysis of bile acids in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: a simple and rapid one-step method. *Clin Chem Lab Med* 41, 1633-1641.
- Tahan, G., Tarcin, O., Tahan, V., Eren, F., Gedik, N., Sahan, E., Biberoglu, N., Guzel, S., Bozbas, A., Tozun, N., *et al.* (2007). The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci* 52, 3348-3354.
- Taya, Y. (1997). RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem Sci* 22, 14-17.
- Taylor, B.S., Alarcon, L.H., and Billiar, T.R. (1998). Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)* 63, 766-781.
- Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2008). Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7, 678-693.
- Thomas, C.E., and Reed, D.J. (1988). Effect of extracellular Ca<sup>++</sup> omission on isolated hepatocytes. II. Loss of mitochondrial membrane potential and protection by inhibitors of uniport Ca<sup>++</sup> transduction. *J Pharmacol Exp Ther* 245, 501-507.
- Thomas, D.D., Heinecke, J.L., Ridnour, L.A., Cheng, R.Y., Kesarwala, A.H., Switzer, C.H., McVicar, D.W., Roberts, D.D., Glynn, S., Fukuto, J.M., *et al.* (2015). Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. *Free Radic Biol Med* 87, 204-225.
- Tiao, M.M., Lin, T.K., Liou, C.W., Wang, P.W., Chen, J.B., Kuo, F.Y., Huang, C.C., Chou, Y.M., and Chuang, J.H. (2009). Early transcriptional deregulation of hepatic mitochondrial biogenesis and its consequent effects on murine cholestatic liver injury. *Apoptosis* 14, 890-899.



- Tokac, M., Taner, G., Aydin, S., Ozkardes, A.B., Dundar, H.Z., Taslipinar, M.Y., Arikok, A.T., Kilic, M., Basaran, A.A., and Basaran, N. (2013). Protective effects of curcumin against oxidative stress parameters and DNA damage in the livers and kidneys of rats with biliary obstruction. *Food Chem Toxicol* 61, 28-35.
- Tran, Q.K., Ohashi, K., and Watanabe, H. (2000). Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 48, 13-22.
- Trauner, M., and Boyer, J.L. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83, 633-671.
- Trauner, M., Meier, P.J., and Boyer, J.L. (1998). Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 339, 1217-1227.
- Trottier, J., Bialek, A., Caron, P., Straka, R.J., Milkiewicz, P., and Barbier, O. (2011). Profiling circulating and urinary bile acids in patients with biliary obstruction before and after biliary stenting. *PLoS One* 6, e22094.
- Uedono, Y., Takeyama, N., Yamagami, K., and Tanaka, T. (1997). Lipopolysaccharide-mediated hepatic glutathione depletion and progressive mitochondrial damage in mice: protective effect of glutathione monoethyl ester. *J Surg Res* 70, 49-54.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
- van der Woerd, W.L., Kokke, F.T., van der Zee, D.C., and Houwen, R.H. (2015). Total biliary diversion as a treatment option for patients with progressive familial intrahepatic cholestasis and Alagille syndrome. *J Pediatr Surg* 50, 1846-1849.
- Vazhappilly, C.G. (2016). Plant polyphenols can protect VEGF-induced vascular leakage? *EXCLI J* 15, 153-154.

- Vazquez-Gil, M.J., Mesonero, M.J., Flores, O., Criado, M., Hidalgo, F., Arevalo, M.A., Sanchez-Rodriguez, A., Tunon, M.J., Lopez-Novoa, J.M., and Esteller, A. (2004). Sequential changes in redox status and nitric oxide synthases expression in the liver after bile duct ligation. *Life Sci* 75, 717-732.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Lupo, L., Memeo, V., and Altomare, E. (2002). Hepatic oxidative alterations in patients with extra-hepatic cholestasis. Effect of surgical drainage. *J Hepatol* 37, 601-605.
- Vera-Ramirez, L., Perez-Lopez, P., Varela-Lopez, A., Ramirez-Tortosa, M., Battino, M., and Quiles, J.L. (2013). Curcumin and liver disease. *Biofactors* 39, 88-100.
- Verde, P., Casalino, L., Talotta, F., Yaniv, M., and Weitzman, J.B. (2007). Deciphering AP-1 function in tumorigenesis: fra-ternizing on target promoters. *Cell Cycle* 6, 2633-2639.
- Verhaag, E.M., Buist-Homan, M., Koehorst, M., Groen, A.K., Moshage, H., and Faber, K.N. (2016). Hormesis in Cholestatic Liver Disease; Preconditioning with Low Bile Acid Concentrations Protects against Bile Acid-Induced Toxicity. *PLoS One* 11, e0149782.
- Verma, A., Maxwell, J.D., Ang, L., Davis, T., Hodges, S., Northfield, T.C., Zaidi, M., and Pazianas, M. (2002). Ursodeoxycholic acid enhances fractional calcium absorption in primary biliary cirrhosis. *Osteoporos Int* 13, 677-682.
- Vieira, E.K., Bona, S., Di Naso, F.C., Porawski, M., Tieppo, J., and Marroni, N.P. (2011). Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. *ISRN Gastroenterol* 2011, 604071.
- Wagner, M., and Trauner, M. (2016). Recent advances in understanding and managing cholestasis. *F1000Res* 5.
- Wang, X., Hattori, Y., Satoh, H., Iwata, C., Banba, N., Monden, T., Uchida, K., Kamikawa, Y., and Kasai, K. (2007). Tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and restores adiponectin levels in rats. *Eur J Pharmacol* 555, 48-53.

- Wariishi, S., Miyahara, K., Toda, K., Ogoshi, S., Doi, Y., Ohnishi, S., Mitsui, Y., Yui, Y., Kawai, C., and Shizuta, Y. (1995). A SP1 binding site in the GC-rich region is essential for a core promoter activity of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 729-735.
- Watson, J.P., Jones, D.E., James, O.F., Cann, P.A., and Bramble, M.G. (1999). Case report: oral antioxidant therapy for the treatment of primary biliary cirrhosis: a pilot study. *J Gastroenterol Hepatol* 14, 1034-1040.
- Wei, C.L., Khoo, H.E., Lee, K.H., and Hon, W.M. (2002). Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats. *Nitric Oxide* 7, 91-102.
- Whitaker, M. (2006). Calcium microdomains and cell cycle control. *Cell Calcium* 40, 585-592.
- Whiteman, M., Spencer, J.P., Szeto, H.H., and Armstrong, J.S. (2008). Do mitochondriotropic antioxidants prevent chlorinative stress-induced mitochondrial and cellular injury? *Antioxid Redox Signal* 10, 641-650.
- Wojtala, A., Bonora, M., Malinska, D., Pinton, P., Duszynski, J., and Wieckowski, M.R. (2014). Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol* 542, 243-262.
- Wolf, A., Trendelenburg, C.F., Diez-Fernandez, C., Prieto, P., Houy, S., Trommer, W.E., and Cordier, A. (1997). Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 280, 1328-1334.
- Woolbright, B.L., Antoine, D.J., Jenkins, R.E., Bajt, M.L., Park, B.K., and Jaeschke, H. (2013). Plasma biomarkers of liver injury and inflammation demonstrate a lack of apoptosis during obstructive cholestasis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 273, 524-531.
- Woolbright, B.L., Dorko, K., Antoine, D.J., Clarke, J.I., Gholami, P., Li, F., Kumer, S.C., Schmitt, T.M., Forster, J., Fan, F., *et al.* (2015).

Bile acid-induced necrosis in primary human hepatocytes and in patients with obstructive cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol* 283, 168-177.

- Woolbright, B.L., and Jaeschke, H. (2016). Therapeutic targets for cholestatic liver injury. *Expert Opin Ther Targets* 20, 463-475.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., and Turner, N.D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134, 489-492.
- Xing, F., Jiang, Y., Liu, J., Zhao, K., Mo, Y., Qin, Q., Wang, J., Ouyang, J., and Zeng, Y. (2006). Role of AP1 element in the activation of human eNOS promoter by lysophosphatidylcholine. *J Cell Biochem* 98, 872-884.
- Xu, J.W., Ikeda, K., and Yamori, Y. (2004). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment. *Hypertension* 44, 217-222.
- Yang, F., Tang, X., Ding, L., Zhou, Y., Yang, Q., Gong, J., Wang, G., Wang, Z., and Yang, L. (2016). Curcumin protects ANIT-induced cholestasis through signaling pathway of FXR-regulated bile acid and inflammation. *Sci Rep* 6, 33052.
- Yousef, M.I., Omar, S.A., El-Guendi, M.I., and Abdelmegid, L.A. (2010). Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food Chem Toxicol* 48, 3246-3261.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182, 367-377.
- Zein, C.O., and Lindor, K.D. (2010). Latest and emerging therapies for primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Curr Gastroenterol Rep* 12, 13-22.

- Zhang, D., Li, J., Gao, J., and Huang, C. (2009). c-Jun/AP-1 pathway-mediated cyclin D1 expression participates in low dose arsenite-induced transformation in mouse epidermal JB6 C141 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 235, 18-24.
- Zhang, M.L., Tao, Y., Zhou, W.Q., Ma, P.C., Cao, Y.P., He, C.D., Wei, J., and Li, L.J. (2014). All-trans retinoic acid induces cell-cycle arrest in human cutaneous squamous carcinoma cells by inhibiting the mitogen-activated protein kinase-activated protein 1 pathway. *Clin Exp Dermatol* 39, 354-360.
- Zhang, R., Min, W., and Sessa, W.C. (1995). Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem* 270, 15320-15326.
- Zheng, D.M., Kitamura, T., Ikejima, K., Enomoto, N., Yamashina, S., Suzuki, S., Takei, Y., and Sato, N. (2006). Sphingosine 1-phosphate protects rat liver sinusoidal endothelial cells from ethanol-induced apoptosis: Role of intracellular calcium and nitric oxide. *Hepatology* 44, 1278-1287.
- Ziakas, G.N., Reka, E.A., Gavalas, A.M., Eleftheriou, P.T., Tsiakitzi, K.C., and Kourounakis, P.N. (2005). Nitric oxide releasing derivatives of tolfenamic acid with anti-inflammatory activity and safe gastrointestinal profile. *Bioorg Med Chem* 13, 6485-6492.
- Zimmermann, H., Kurzen, P., Klossner, W., Renner, E.L., and Marti, U. (1996). Decreased constitutive hepatic nitric oxide synthase expression in secondary biliary fibrosis and its changes after Roux-en-Y choledocho-jejunostomy in the rat. *J Hepatol* 25, 567-573.
- Zingarelli, B., Day, B.J., Crapo, J.D., Salzman, A.L., and Szabo, C. (1997). The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock. *Br J Pharmacol* 120, 259-267.

## **IX. ANEXOS**



## Mitochondrial-Driven Ubiquinone Enhances Extracellular Calcium-Dependent Nitric Oxide Production and Reduces Glycochenodeoxycholic Acid-Induced Cell Death in Hepatocytes

Sandra González-Rubio,<sup>†</sup> Ana B. Hidalgo,<sup>†</sup> Gustavo Ferrín,<sup>†,‡</sup> Rosario I. Bello,<sup>†</sup> Raul González,<sup>†,‡</sup> Manuel D. Gahete,<sup>§,||</sup> Isidora Ranchal,<sup>†,‡</sup> Blanca A. Rodríguez,<sup>†</sup> Pilar Barrera,<sup>†,‡</sup> Patricia Aguilar-Melero,<sup>†</sup> Clara I. Linares,<sup>†</sup> Justo P. Castaño,<sup>§,||</sup> Victor M. Victor,<sup>‡,⊥</sup> Manuel De la Mata,<sup>†,‡</sup> and Jordi Muntané<sup>\*,†,‡</sup>

*Liver Research Unit, Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREH o Ciberehd), Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, Córdoba, Spain, CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición CB06/03, Spain, and Service of Endocrinology, Hospital University Doctor Peset Foundation, Valencia, Spain*

Received August 7, 2009

Ca<sup>2+</sup> mobilization, nitric oxide (NO), and oxidative stress have been involved in cell death induced by hydrophobic bile acid in hepatocytes. The aim of the study was the elucidation of the effect of the antioxidant mitochondrial-driven ubiquinone (Mito Q) on the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, NO production, and cell death in glycochenodeoxycholic acid (GCDCA)-treated HepG2 cells. The role of the regulation of the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration by Ca<sup>2+</sup> chelators (EGTA or BAPTA-AM), agonist of Ca<sup>2+</sup> entrance (A23187) or NO (L-NAME or NO donor), was assessed during Mito Q cytoprotection in GCDCA-treated HepG2 cells. Cell death, NO synthase (NOS)-1, -2, and -3 expression, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and NO production were evaluated. GCDCA reduced the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and NOS-3 expression and enhanced cell death in HepG2. NO donor prevented and L-NAME enhanced GCDCA-induced cell death. The reduction of Ca<sup>2+</sup> entry by EGTA, but not its release from intracellular stores by BAPTA-AM, reduced the expression of NOS-3 and enhanced cell death in control and GCDCA-treated cells. Mito Q prevented the reduction of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, NOS-3 expression, NO production, and cell death in GCDCA-treated HepG2 cells. The conclusion is that the recovery of Ca<sup>2+</sup>-dependent NOS-3 expression by Mito Q may be considered an additional cytoprotective property of an antioxidant.

### Introduction

Cholestatic liver disorders are a heterogeneous group of diseases with impaired bile flow that are implicated in different relevant liver dysfunctions such as biliary atresia, primary biliary cirrhosis, and primary sclerosing cholangitis (1). Cholic acid and chenodeoxycholic acid are the two primary bile acids in humans (2). Bile acids are secreted into bile ducts after glycine or taurine conjugation. More than 95% of the bile acid pool is reabsorbed from the intestine and transported to the liver, where they evoke an inhibitory feedback control on bile acid synthesis. Different amounts of deoxycholic acid and lithocholic acid, generated after cholic and chenodeoxycholic bacterial dehydroxylation, are passively reabsorbed from the colon. The unrevealing of the cellular and molecular events leading to cell death induced by toxic bile acid is critical to planning new interventional strategies. The retention of certain dihydroxyhydrophobic bile acids, such as the glycine conjugates of

chenodeoxycholic acid (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA)<sup>1</sup> in the liver, is believed to play an important role in the pathogenesis of cholestatic liver injury (3, 4). The circulating hepatocellular enzymes and the presence of acidophilic bodies in liver sections from cholestatic patients suggest the presence of liver injury in the disease (5). The exposure of high concentrations of hydrophobic bile acids has been associated with hepatocellular injury (6, 7). Several markers of cellular apoptosis have also been identified in bile acid-induced cell death in cultured hepatocytes (8, 9) and hepatoma cells (10, 11). The involvement of mitochondria and reactive oxygen species (ROS) production has been demonstrated during bile acid-induced apoptosis and necrosis in hepatocytes (11–13).

Nitric oxide (NO) exerts a key role on the hepatic metabolism and liver injury induced by different agents (14, 15). The three described nitric oxide synthase (NOS) isoforms are present in the liver, with the inducible (iNOS or NOS-2) and endothelial constitutive (eNOS or NOS-3) forms the most abundant ones (15). The expression of the neuronal constitutive (nNOS or NOS-1) form is limited to the nervous terminations of the liver

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: (34)(957)011070. Fax: (34)(957)010452. E-mail: jordi.muntane.exts@juntadeandalucia.es.

<sup>†</sup> Reina Sofía University Hospital.

<sup>‡</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas.

<sup>§</sup> University of Córdoba.

<sup>||</sup> CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición.

<sup>⊥</sup> Hospital University Doctor Peset Foundation.

<sup>1</sup> Abbreviations: O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide anion; DCFDA, 2,2-dichlorofluorescein diacetate dye; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; Mito Q, mitochondria-driven ubiquinone; LDH, lactate dehydrogenase; Ac-DEVD-AFC, *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; PBS, phosphate buffer solution; ROS, reactive oxygen species; NONOate, (Z)-1-[2-(2-aminoethyl)-*N*-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate.



blood vessels (15). NO has been shown to exert pro-apoptotic and antiapoptotic effects in cultured hepatocytes (16–19). The beneficial properties may be explained by its capacity to stimulate cGMP production, caspase nitrosylation, inhibition of Bid cleavage and translocation to mitochondria, and inhibition of the mitochondria permeability transition (16). The pro-apoptotic properties of NO are associated with alteration of mitochondrial potential and release of apoptotic factors, p53 activation, alteration of bcl-2 expression, and ceramide production upon caspase-3 activation (20, 21). GCDCA prevented NOS-2 expression and NO production in cytokine-treated rat hepatocytes (22). NO donor prevented caspase-3 activity and apoptosis induced by GCDCA in cultured rat hepatocytes (22, 23).

The expression of NOS-3, but not NOS-1 and NOS-2, was reliably quantified in control and GCDCA-treated HepG2 cells. The aim of the present study was the identification of the cellular events regulating NOS-3 expression during GCDCA-induced cell death in hepatocytes. Several reports have shown that the elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration increased NOS-2 gene and/or protein expression and subsequent NO production (24). In this sense, the study evaluated the role of Ca<sup>2+</sup>, intracellular and extracellular, on the expression of NOS-3 and cell death in GCDCA-treated hepatocytes. In addition, we tested if the cytoprotective properties of known antioxidant mitochondria-driven ubiquinone (Mito Q) were related to the alteration to intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and NOS-3 expression in GCDCA-treated hepatocytes.

## Experimental Procedures

**Cell Culture.** HepG2 cells (human hepatoma) were obtained from the NIH ATCC repository (Bethesda, MD) and maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM) (M0643, Sigma-Aldrich) culture medium supplemented with sodium pyruvate (1 mM), NaHCO<sub>3</sub> (2.2 g/L), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), amphotericin B (0.25 µg/mL), and 10% fetal bovine serum (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Forty-eight hours after seeding, cell death was induced by GCDCA (500 µM), and cells were harvested at different time points according to the studied parameter. An extracellular [ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 3 mM] or intracellular (BAPTA-AM, 10 µM) Ca<sup>2+</sup> chelator was preadministered (2 h) to GCDCA-treated hepatocytes in experiments to evaluate their involvement on cell death parameters and NOS-3 expression. BAPTA-AM is a cell-permeable derivative, which becomes active upon intracellular activation by esterase. The increase of extracellular Ca<sup>2+</sup> entrance was induced by A23187 (0.5 µM) coadministration in GCDCA-treated hepatocytes. The inhibition of Ca<sup>2+</sup> sequestration by endoplasmic reticulum was carried out by thapsigargin (5 µM) in control hepatocytes. A NOS inhibitor (L-NAME, 0.5 mM) or NO donor [(Z)-1-[2-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate or NONOate, 0.3 mM] was preadministered (2 h) to GCDCA-treated HepG2 cells. Mito Q (1 µM) was coadministered to GCDCA-treated hepatocytes. Mito Q is an ubiquinone derivative targeted to mitochondria by covalent attachment to a lipophilic triphenylphosphonium cation through an aliphatic carbon chain. Mito Q was synthesized according to the procedure described by Kelso et al. (25).

**Measurement of ROS Production.** Different fluorescent probes have been developed for the measurement of oxidative and nitrosative stress in cells (26). The use of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA; Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands) is by far the most common probe for measurement of ROS production. DCFDA (or DCFH<sub>2</sub>) is potentially oxidized by CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>•</sup> radicals. DCFDA has very low reactivity toward superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), whose increased reactivity probably reflects the presence of metal in the cell system (Fenton chemistry) (27). The contribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to

the oxidation of DCFDA was determined with the preincubation (30 min) of cells with catalase (500 U/mL). Hepatocytes were incubated with DCFDA (2 µM) for 30 min. The culture medium was removed and replaced with PBS to avoid any interference with the measurement of cell fluorescence. The fluorescence emitted by DCFDA (Ex = 500, and Em = 520) was assessed *in situ* using a GENios Microplate Reader (TECAN).

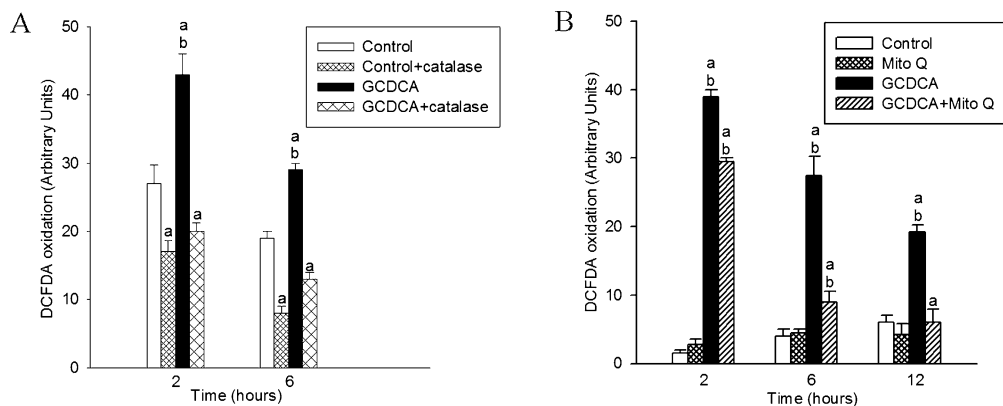
**Preparation of the Cytoplasm and Nuclear Extracts.** The cytoplasm and nuclear fractions from hepatocytes (3 × 10<sup>6</sup>) were obtained by cell fractionation (28). Briefly, hepatocytes were treated with lysis buffer (800 µL) containing 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM EGTA, 5 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol (DTT), and 0.6% Nonidet NP-40 for 10 min on ice. Afterward, samples were homogenized and centrifuged at 15000g for 3 min at 4 °C. Aliquots of the supernatant (cytoplasm) were stored at -80 °C until use for the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) release and caspase-3 activation. The pellet (nuclear fraction) was discarded.

**Measurement of LDH Release.** LDH in the culture medium (130 µL) and cytoplasm (5 µL) was assessed with 0.2 mM β-NADH and 0.4 mM pyruvic acid up to 200 µL of PBS, pH 7.4. The LDH concentration in the sample was proportional to the rate of NADH oxidation measured by the absorbance at 334 nm (OD/min) using a GENios Microplate Reader (TECAN). The LDH concentration in the cytoplasm and culture medium was calculated using a commercial standard (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). The LDH release (%) was calculated as the ratio [(LDH culture medium)/(LDH cytoplasm + LDH culture medium)] × 100.

**Assay for Caspase-3-Associated Activity.** The cytoplasm fraction obtained above was used to measure caspase-3 activity in hepatocytes. The caspase-3-associated activity in the sample (25 µg) was measured using N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (Ac-DEVD-AFC, Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) (100 µM) in caspase-incubating buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 1 mM EDTA, and 5 mM DTT) up to 100 µL of total volume. The fluorescence of the sample (Ex = 400, and Em = 505) was recorded using a GENios Microplate Reader (TECAN, Salzburg, Austria).

**Measurement of NO Production.** The release of NO was assessed by the quantification of its related end products, nitrite + nitrate. In the assay, nitrate was converted to nitrite by nitrate reductase (EC 1.6.6.2), and total nitrite was measured using the Griess reaction (29). Briefly, the samples were incubated with 0.2 U/mL nitrate reductase, 5 mM FAD, and 50 mM NADPH at 37 °C for 20 min. The reaction was stopped by the addition of 10 mM sodium pyruvate and 24 mg/mL LDH at 37 °C for 5 min and precipitated with 1.4% ZnSO<sub>4</sub>. Total nitrite reacted with Griess reagent (1% sulphanilamide, 2.5% PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>, and 0.1% *n*-naphthyl-ethylene-diamine) at 37 °C for 10 min, and the absorbance was read at 540 nm using a GENios Microplate Reader (TECAN).

**Measurement of Free Cytosolic Calcium Concentration in Single Cells.** The free cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration was determined using the fluorescent calcium probe fluo4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR). HepG2 cells (15000 cells/cm<sup>2</sup>) were incubated with supplemented EMEM (without fetal bovine serum) plus 2.5 µM fluo4-AM and 0.02% pluronic acid (stock solution × 1000 in Me<sub>2</sub>SO) for 30 min. After loading, cells were washed in phosphate buffer solution (PBS) (to remove any dye nonspecifically associated with the cell surface), and fresh media were added including treatments (EGTA, BAPTA-AM, thapsigargin, A23187, and Mito Q when required). GCDCA was administered either at 5 min after EGTA or Mito Q or at 20 min after BAPTA-AM. The fluorescence was recorded for 5 or 20 min (accordingly to the treatment) before GCDCA, as well as for 4 min after GCDCA administration. The images were collected with a Nikon Eclipse TE2000 E microscope (Nikon, Tokyo, Japan), and the signal (Ex = 488 nm, and Em = 543 nm) was processed by the MetaFluor Software (Imaging Corp., West Chester, PA).



**Figure 1.** Effect of Mito Q on the production of ROS in GCDCA-treated HepG2 cells. The production of ROS was assessed by the oxidation of DCFDA in control and GCDCA (0.5 mM)-treated HepG2 cells. Mito Q was coadministered to GCDCA-treated HepG2 cells. The contribution of  $H_2O_2$  to the oxidation of DCFDA was determined by the preincubation (30 min) of cells with catalase (500 U/mL). The procedure for the measurement of ROS production by DCFDA is described in the Experimental Procedures. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs the corresponding control group. The groups with "b" were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.

**Total RNA Isolation and Quantitative Real-Time RT-PCR Procedure.** Total RNA from HepG2 cells was extracted using Trisure (Bioline, London, United Kingdom) reagent according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies Inc.). RNA was precipitated using ice-cold isopropanol, washed with 75% ethanol, and resuspended in RNase-free water (Sigma). RNA was treated with DNase I (Promega, Madison, WI) (1 IU/ $\mu$ g RNA) at 37 °C for 30 min. DNase I was degraded at 65 °C for 10 min. The integrity of RNA was verified following separation by electrophoresis on 0.8% agarose gel containing 0.5% (v/v) ethidium bromide.

The expression of mRNA for NOS-1, NOS-2, and NOS-3 was examined by quantitative real-time RT-PCR using the LightCycler thermal cycler system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). RT-PCR was performed in one step, using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was performed with 5 ng/ $\mu$ L of total RNA diluted in reaction mixture including Omniscript and Sensiscript Reverse Transcriptase, as well as the specific sets of primers for human NOS-1 (sense, 5'-CCCCA CCTCA GGAAA ACAGT C-3'; and antisense, 5'-CTCTG TGTCC TTGAG CTGGT AAG-3'), NOS-2 (BIOSOURCE, Nivelles, Belgium) (catalog number GHO0144, cDNA reference GenBank U05810) and NOS-3 (sense, 5'-AGGGC GACAT GGAGC TGGAC GAG-3'; and antisense, 5'-GTGTC TGAGC CGGGA GGGTC GAA-3') and 18S (MVG-Biotech AG, Getotek, Sabadell, Spain) (sense, 5'-GTAAC CCGTT GAACC CCATT-3'; and antisense, 5'-CCATC CAATC GGTAG TAGCG-3').

The RT conditions were 20 min at 55 °C and 15 min at 95 °C. The amplification protocol consisted of 50 cycles of incubation after initial denaturation at 95 °C for 20 s (20 °C/s), 60 °C for 20 s (20 °C/s), and 72 °C for 25 s (2 °C/s). The melting conditions were fixed at 65 °C (0.1 °C/s). To confirm amplification specificity, the amplified fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide, the PCR products were subjected to a melting curve analysis, and negative and positive controls containing either RNase-free water or control positive solution (BIOSOURCE) instead of sample were run to confirm that the samples were not cross-contaminated. Quantitation of relative expression was determined by the  $2^{-(\Delta C_t)}$  method.

**NOS-3 Expression.** NOS-3 expression was assessed by Western blot analysis in cytoplasm fraction. Proteins (50  $\mu$ g) were separated by 6% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The membranes were incubated with the corresponding primary rabbit polyclonal (1/1000) (sc-654, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA) antibodies and secondary goat antirabbit polyclonal (1/50000) (sc-2301, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) antibodies coupled to horseradish peroxidase, revealing the protein content by commercial enhanced chemiluminescence (ECL) assay (RPN2135, GE Healthcare).

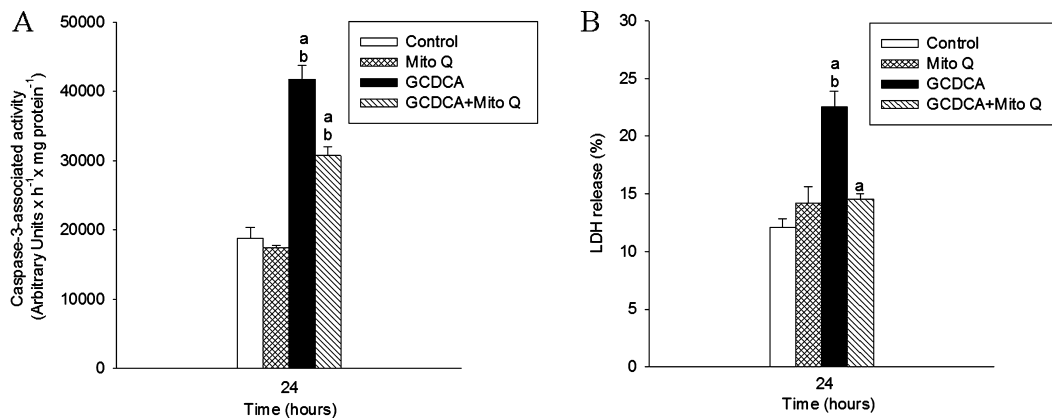
$\beta$ -Actin, used as internal protein loading, was identified with commercial rabbit polyclonal antibodies (1/5000) (ab8227, Abcam, Cambridge, United Kingdom). A purified commercial NOS-3 (catalog number 360880, Cayman, Ann Arbor, MI) protein was used as a standard.

**Statistical Analysis.** Results are expressed as means  $\pm$  SEMs of five experiments. Data were compared using analysis of variance with the least significant difference (LSD) test as posthoc multiple comparison analysis. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs the corresponding control group. The groups with "b" were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.

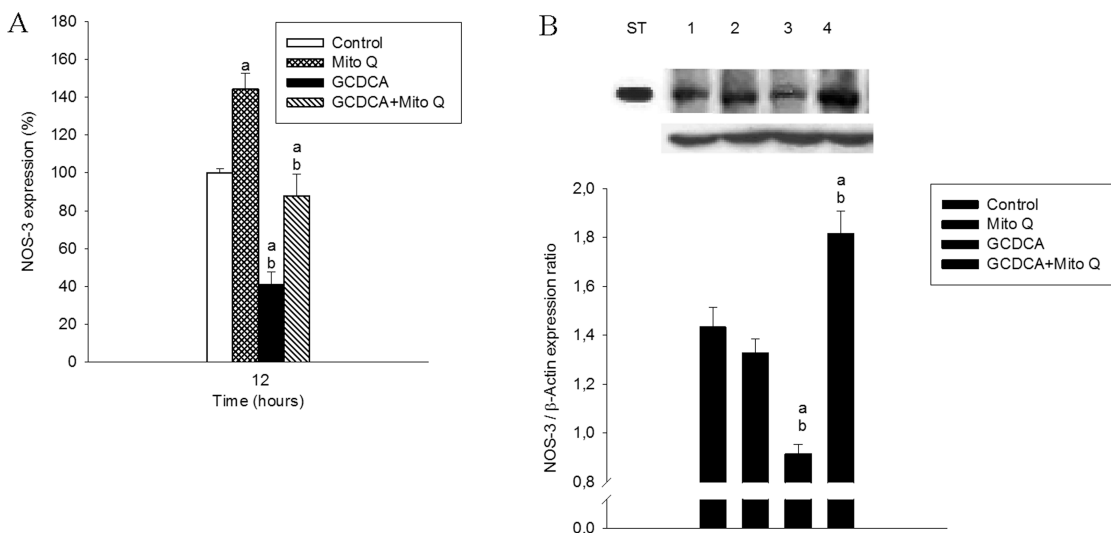
## Results

**Mito Q Reduced Oxidative Stress and Cell Death Induced by GCDCA.** The hepatocellular injury induced by GCDCA is associated with ROS production in hepatocytes (11, 12). The administration of different antioxidants, such as  $\alpha$ -tocopherol, ebselen (a peroxiredoxin mimetic), bilirubin, or lazaroid, reduced ROS generation, and apoptosis induced by GCDCA (13, 30, 31). The administration of catalase showed that around 50% of DCFDA oxidation was caused by  $H_2O_2$  in GCDCA-treated hepatocytes. (Figure 1A) ( $p \leq 0.05$ ). The coadministration of Mito Q reduced DCFDA oxidation in GCDCA-treated hepatocytes (Figure 1B) ( $p \leq 0.05$ ). The coadministration of Mito Q reduced caspase-3 activity (Figure 2A) and hepatocellular necrosis (Figure 2B) induced by GCDCA in HepG2 ( $p \leq 0.05$ ).

**Role of NOS-3 in GCDCA-Treated Hepatocytes.** NO is mainly produced by NOS-2 and NOS-3 in hepatocytes (15). We were not able to detect a reliable mRNA and protein expression of NOS-1 and NOS-2 in HepG2. However, NOS-3 mRNA and protein content were systematically detected in HepG2 cells. GCDCA prevents the induction of NOS-2 expression and NO production in cultured rat hepatocytes (22). The induction of hepatocellular injury by GCDCA (Figure 2) was related to a reduction in NOS-3 mRNA (Figure 3A) and protein (Figure 3B) expression, as well as NO production (Table 1) in HepG2 ( $p \leq 0.05$ ). In concordance with Bucher et al. (22), the exogenous NO supplementation with NONOate prevented caspase-3 activity (Figure 4) induced by GCDCA in hepatocytes. The preadministration of the NOS inhibitor, L-NAME, enhanced caspase-3 activity in GCDCA-treated hepatocytes (Figure 4) ( $p \leq 0.05$ ). Mito Q increased the nitrite + nitrate concentration in culture medium obtained from GCDCA-treated hepatocytes



**Figure 2.** Effect of Mito Q on caspase-3-associated activity (A) and LDH release (B) in GCDCA-treated HepG2 cells. Mito Q was coadministered to GCDCA-treated HepG2 cells. Caspase-3-associated activity was assessed using Ac-DEVD-AFC as the corresponding peptide-based substrates. LDH release represents the percentage of LDH in the culture medium in relation to total LDH. Each bar represents the mean ± SE of five independent experiments. The statistical differences were set at *p* ≤ 0.05. The groups with “a” were significantly different vs the corresponding control group. The groups with “b” were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.



**Figure 3.** Effect of Mito Q on the NOS-3 expression in GCDCA-treated HepG2 cells. Mito Q was coadministered to GCDCA-treated HepG2 cells. The mRNA expression (A) was determined by quantitative RT-PCR using the procedure and the primers described in the Experimental Procedures. The NOS-3 protein expression (B) was assessed by SDS electrophoresis coupled to Western blot analysis (line 1, control; line 2, Mito Q; line 3, GCDCA; and line 4, GCDCA + Mito Q). The statistical analysis of densitometric values of the spots is shown below each blot. β-Actin was used as internal protein loading. Each bar represents the mean ± SE of five independent experiments. The statistical differences were set at *p* ≤ 0.05. The groups with “a” were significantly different vs the corresponding control group. The groups with “b” were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.

**Table 1. Effect of Mito Q on the Concentration of NO End Products in GCDCA-Treated HepG2 Cells<sup>a</sup>**

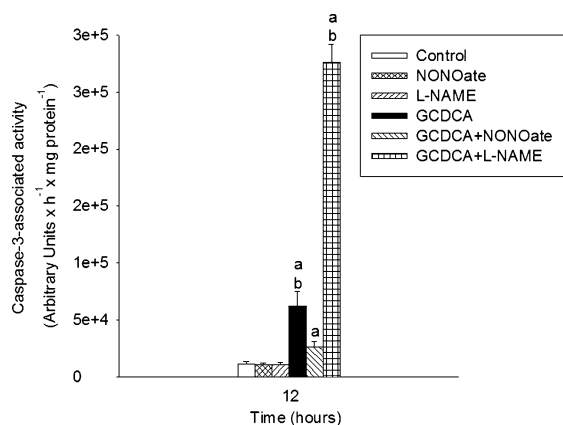
treatments	nitrite/nitrate (μM)
control	9.5 ± 0.20
Mito Q	8.7 ± 0.27
GCDCA	6.1 ± 0.45 a, b
GCDCA + Mito Q	8.0 ± 0.98 a

<sup>a</sup> Mito Q was co-administered to GCDCA-treated HepG2 cells. The nitrite + nitrate concentration in culture medium was determined by the Griess reaction as described in the Experimental Procedures. Each bar represents the mean ± SE of five independent experiments. The statistical differences were set at *p* ≤ 0.05. The groups with “a” were significantly different vs the corresponding control group. The groups with “b” were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.

(Table 1). In addition, the administration of Mito Q increased NOS-3 mRNA (Figure 3A) and protein (Figure 3B) expression in GCDCA-treated HepG2.

**Role of Calcium and NOS-3 in GCDCA-Treated Hepatocytes.** The induction of apoptosis by GCDCA has been associated with an increase in the intracellular concentration of

Mg<sup>2+</sup> but not Ca<sup>2+</sup> (9) and PKC activation (10) in rat hepatocytes. The administration of EGTA, but not BAPTA-AM, reduced the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in HepG2 cells (Figure 5A). The incubation with A23187 or thapsigargin induced a sharp or gradual increase in the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, respectively (Figure 5A). This observation suggests that the extracellular Ca<sup>2+</sup> entrance and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> sequestration are functional. GCDCA induced a transient reduction of the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in HepG2 (Figure 5B). However, GCDCA did not change the reduction of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration induced by EGTA (Figure 5B). This may suggest that GCDCA was not able to induce Ca<sup>2+</sup> release from endoplasmic reticulum stores. This idea was also supported by the inability of BAPTA-AM to change intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration measured by fluo4-AM in GCDCA-treated HepG2 cells (Figure 5B). The coadministration of an extracellular Ca<sup>2+</sup> chelator (EGTA), but not intracellular Ca<sup>2+</sup> chelator (BAPTA-AM), drastically enhanced caspase-3 activity (Figure 6A) and LDH release (Figure 6B) in GCDCA-treated hepatocytes (*p* ≤ 0.05). The intracellular Ca<sup>2+</sup>



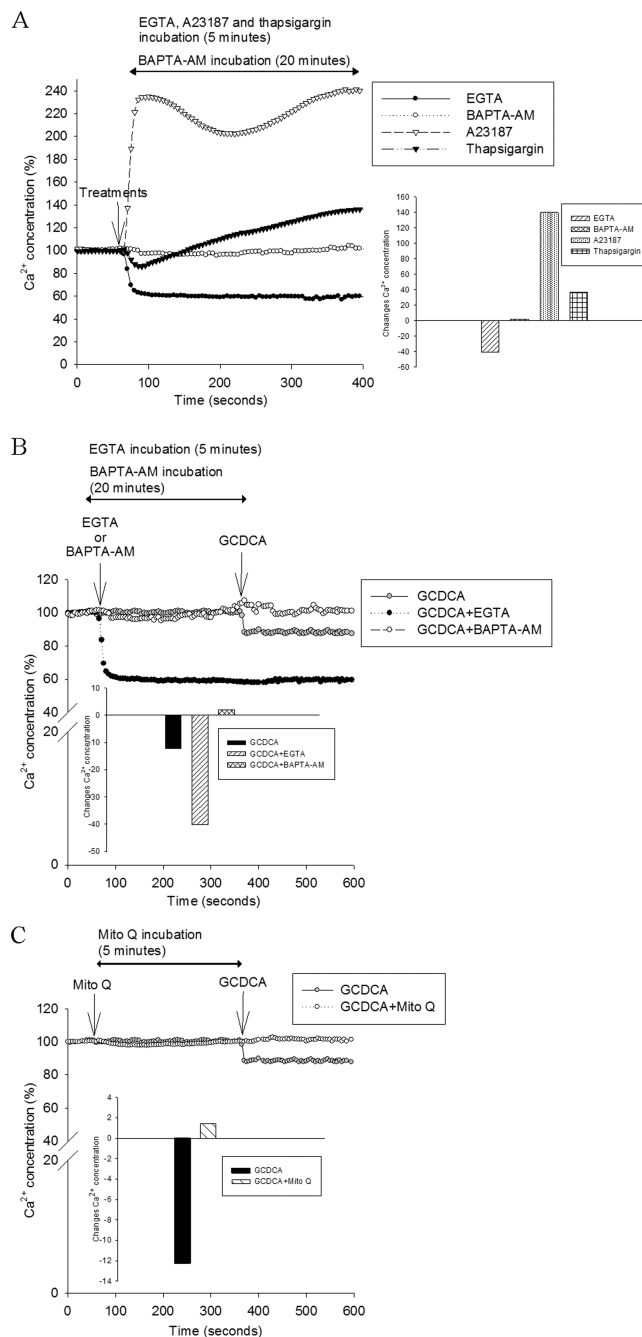
**Figure 4.** Effect of an inhibitor of NOS and NO donor on the caspase-3-associated activity in GCDCA-treated HepG2 cells. L-NAME and NONOate were used as the NOS inhibitor and NO donor, respectively. L-NAME and NONOate were administered 2 h before GCDCA in HepG2. Caspase-3-associated activity was assessed using Ac-DEVD-AFC as the corresponding peptide-based substrates. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with “a” were significantly different vs the corresponding control group. The groups with “b” were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.

concentration is important for the expression of NOS-2 in inflammatory cells (24). The reduction of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration drastically prevents NOS-3 overexpression induced by blood flow perturbation in endothelial cells (32). EGTA, but not BAPTA-AM, reduced NOS-3 expression in control cells (Figure 7) ( $p \leq 0.05$ ). The cytoprotective properties of Mito Q (Figure 2) were related to the prevention of GCDCA-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 5C) and NOS-3 expression (Figure 3) reduction in HepG2. Interestingly, an agonist of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  entrance, such as A23187 (Figure 5A), reduced caspase-3 activation (Figure 8A) and LDH release (Figure 8B) induced by GCDCA in HepG2 ( $p \leq 0.05$ ). This effect of A23187 was related to a marked increase in NOS-3 expression in control and GCDCA-treated HepG2 cells (Figure 8C) ( $p \leq 0.05$ ).

## Discussion

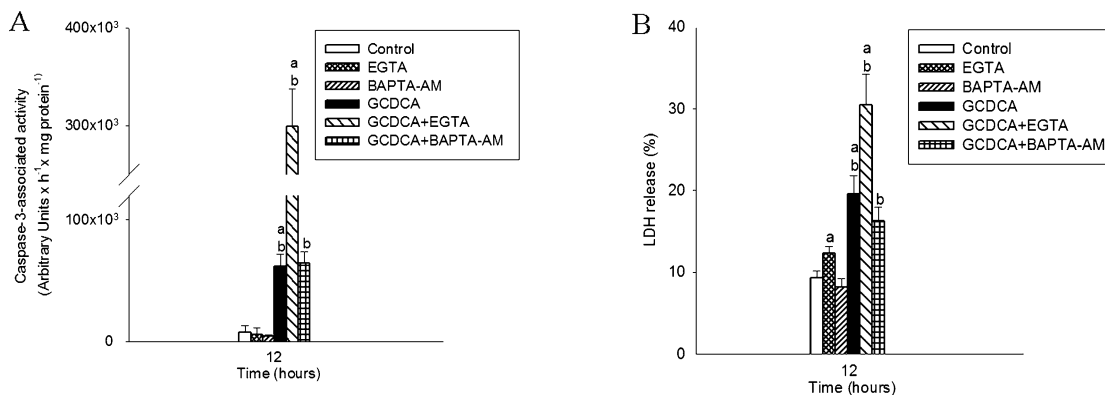
The accumulation of toxic hydrophobic bile acid induces cell injury in hepatocytes. The main finding of our study is the important role of  $\text{Ca}^{2+}$  and NOS-3 during cell death induced by GCDCA in HepG2. The reduction of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and NOS-3-derived NO was associated with a rise of apoptotic and necrotic markers induced by GCDCA in HepG2. In addition, the beneficial properties of antioxidants, such as Mito Q, were related to the prevention of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  reduction and recovery of NOS-3 expression in GCDCA-treated HepG2 cells.

The exposure of hydrophobic bile acids has been associated with the induction of apoptosis in cultured hepatocytes (8, 9) and hepatoma cell line (10, 11). Patel et al. (9) have shown that the initial onset of apoptosis by low concentration of GCDCA (50  $\mu\text{M}$ ) is related to an increase in the intracellular free  $\text{Mg}^{2+}$ , but not  $\text{Ca}^{2+}$ , concentration. Nevertheless, the hepatocellular necrosis induced by a high concentration of GCDCA (250  $\mu\text{M}$ ) is related to mitochondrial dysfunction, ATP depletion, and a sustained rise in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in rat hepatocytes (33). Under our conditions, features of apoptosis and necrosis were observed, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  and oxidative stress might have an important role in GCDCA-treated HepG2 cells. Moreover, the addition of GCD-

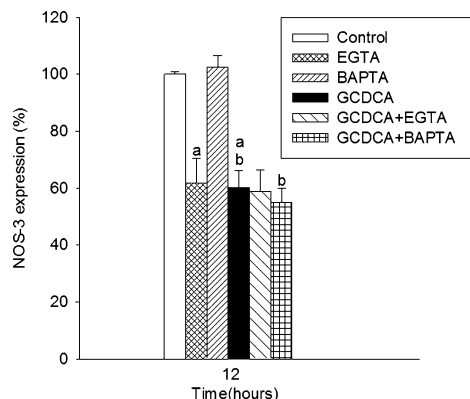


**Figure 5.** Regulation of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by  $\text{Ca}^{2+}$  chelators in control (A) and GCDCA-treated (B) cells, as well as by Mito Q (C) in GCDCA-treated HepG2 cells. The intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was assessed by fluo4-AM. After cell incubation (30 min) with the probe, cells were washed and the corresponding treatments were added (EGTA, BAPTA-AM, thapsigargin, A23187, or Mito Q). GCDCA was administered either at 5 min after EGTA or Mito Q or at 20 min after BAPTA-AM. The fluorescence was recorded for 5 or 20 min (accordingly to the treatment) before GCDCA, as well as for 4 min after GCDCA administration. The fluorescence (Ex = 488 nm, and Em = 543 nm) was recorded by a Nikon Eclipse TE2000 E microscope and processed by the MetaFluor Software as described in the Experimental Procedures. The images are representative of four independent experiments.

CA was followed by a transient reduction in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The entrance of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  but not  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores appeared as an essential requirement for the survival of cultured HepG2. The administration of an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelator such as EGTA, but not BAPTA-AM, reduced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and enhanced cell death in control and GCDCA-treated cells. The



**Figure 6.** Effect of Ca<sup>2+</sup> chelators on the caspase-3-associated activity (A) and LDH release (B) in GCDCA-treated HepG2 cells. EGTA and BAPTA-AM were preadministered (2 h) to GCDCA-treated HepG2 cells. Caspase-3-associated activity was assessed using Ac-DEVD-AFC as the corresponding peptide-based substrates. LDH release represents the percentage of LDH in the culture medium in relation to total LDH. Each bar represents the mean ± SE of five independent experiments. The statistical differences were set at *p* ≤ 0.05. The groups with “a” were significantly different vs the corresponding control group. The groups with “b” were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.



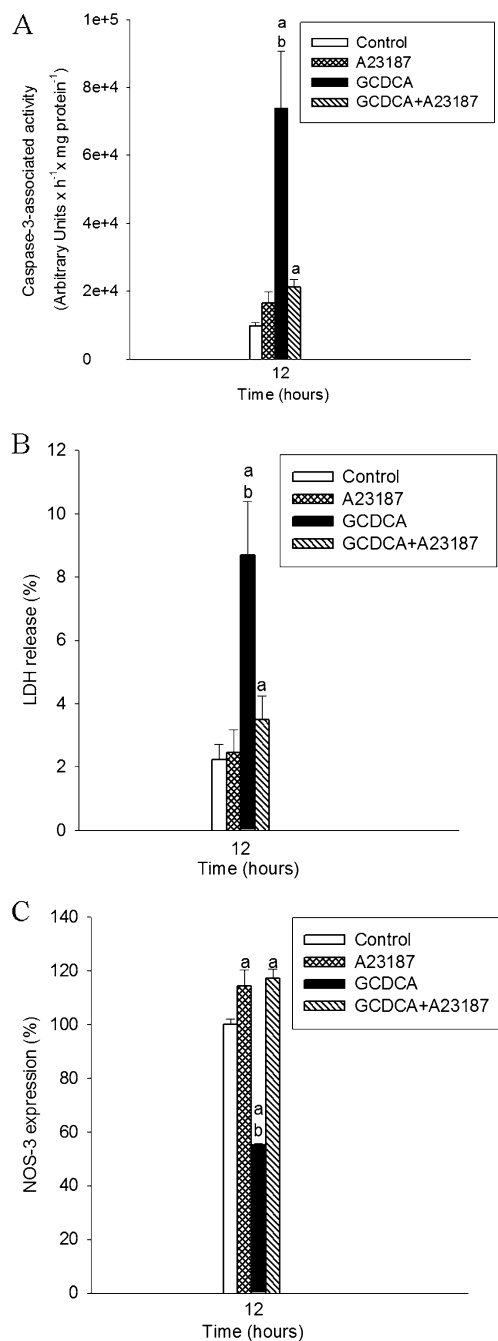
**Figure 7.** Effect of Ca<sup>2+</sup> chelators on NOS-3 mRNA expression in GCDCA-treated HepG2 cells. EGTA and BAPTA-AM were preadministered (2 h) to GCDCA-treated HepG2 cells. The mRNA expression was determined by quantitative RT-PCR using the procedure and the primers described in the Experimental Procedures. Each bar represents the mean ± SE of five independent experiments. The statistical differences were set at *p* ≤ 0.05. The groups with “a” were significantly different vs the corresponding control group. The groups with “b” were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.

induction of apoptosis by GCDCA has been related to the activation and cell membrane translocation of protein kinase C (PKC)-α, -δ, and -ε in GCDCA-treated hepatocytes (10). Nevertheless, other studies showed that taurochenodeoxycholic acid induces selective translocation of PKC-ε, but not PKC-α, -δ, and -ζ to hepatocellular membrane. Tauroursodeoxycholic acid and its hydrophobic 7α-hydroxi epimer or taurochenodeoxycholic acid, agents used for the treatment of cholestatic disorders, enhanced intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration (34) through Ni<sup>2+</sup>-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels, with cell membrane translocation of PKC-α in cultured hepatocytes (35). Beuers et al. (36) showed that the beneficial properties of ursodeoxycholic acid may be related to enhanced vesicular exocytosis by Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC activation in plasma membrane.

The involvement of mitochondria ROS production has also been clearly demonstrated in GCDCA-treated hepatocytes (11–13). ROS are mediators in the alteration of calcium homeostasis, which precedes other morphological and functional cellular alterations (37). Low concentrations (1–10 μM) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exhibit no effect on cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration, while 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced intracellular oscillations in human aortic endothelial cells (38). The reduction of DCFDA oxidation by catalase suggests that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was partly involved in the ROS-dependent oxidation of DCFDA in GCDCA-treated

HepG2 cells. The study suggests that ROS production was related to alteration of Ca<sup>2+</sup> entrance, but not intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, during GCDCA-induced cytotoxicity in HepG2 cells. In nonelectrically excitable cells, Ca<sup>2+</sup> influx is mainly mediated by receptor-operated channels, second messenger-operated channels, or store-operated channels. Although no clear evidence exists about the role of ROS on the activation of second messenger-operated channels, oxidative stress has been shown to prevent Ca<sup>2+</sup> entry through receptor-operated channels (39). The main mechanism for Ca<sup>2+</sup> entry in nonexcitable cells is through store-operated channels (40). The store-operated channels have been reported to be reduced by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations ≥100 μM through activation of PKC (41). The induction of ROS by NS5A and core proteins altered Ca<sup>2+</sup> entry and extrusion by the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in Huh7-transfected cells (42). The administration of mitochondrial-targeted antioxidant, or Mito Q, prevented the reduction of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, increased NOS-3 expression, and reduced cell death induced by GCDCA in HepG2. The association between Ca<sup>2+</sup> and NOS-3 expression was further confirmed by the reduction in NOS-3 expression in EGTA-treated HepG2 cells. Ca<sup>2+</sup> entry participates in NOS-3 expression (43) and is essential for NOS-3 activation (44) in endothelial cells. Another antioxidant, such as *N*-acetylcysteine, has been shown to increase both NOS-3 mRNA and protein expression in endothelial cells (45). It is feasible that the antioxidant may increase NOS activity by stabilization of its dimeric form, as well as extending NO half-life through its ROS scavenging activity. However, the kinetic constants suggest that the rate of reactions between common antioxidants and O<sub>2</sub><sup>•</sup> is much slower than the rate of the reaction between O<sub>2</sub><sup>•</sup> and NO (46, 47). This raises the possibility that antioxidants may have other effects on the NO pathway beyond those described above. The promoter of human NOS-3 gene contains simian virus 40 promoter factor 1 (Sp-1), activator protein 1 (AP-1), and antioxidant response elements (48), all of which are regulated by cellular redox state (49, 50). The Sp1 site is an important positive *cis*-element in the core NOS-3 promoter, and the deletion of AP-1 sequence (–1600 to –1300-bp) increased the promoter NOS-3 activity (48). Bert et al. (51) showed that AP-1 transcriptional activity increased by 40% after exposure to GCDCA in HepG2 cells. In addition, the administration of an inhibitor of AP-1 (51) or the regulation of AP-1 expression by tauroursodeoxycholate (52) reduces GCDCA-induced apoptosis in HepG2 cells.

In conclusion, our study suggests that the administration of Mito Q increased the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and NOS-3



**Figure 8.** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  entrance agonist on caspase-3-associated activity (A), LDH release (B), and NOS-3 expression (C) in GCDCA-treated HepG2 cells.  $\text{Ca}^{2+}$  entrance agonist or A23187 was coadministered to GCDCA-treated HepG2 cells. Caspase-3-associated activity was assessed using Ac-DEVD-AFC as the corresponding peptide-based substrates. LDH release represents the percentage of LDH in the culture medium in relation to total LDH. The mRNA expression was determined by quantitative RT-PCR using the procedure and the primers described in the Experimental Procedures. Each bar represents the mean (SE) of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs the corresponding control group. The groups with "b" were significantly different vs the corresponding group without GCDCA.

expression and reduced cell death induced by GCDCA in HepG2 cells. Further studies are required to elucidate the mechanisms by which ROS production affect  $\text{Ca}^{2+}$  entrance, as well as the relevant impact of the antioxidant on AP-1-dependent transcriptional regulation of NOS-3 expression in GCDCA-induced cell death in HepG2.

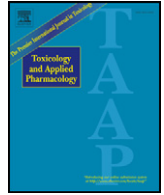
**Acknowledgment.** This study has been supported by the Instituto de Salud Carlos III (FIS 02/0181, FIS 05/0703, and FIS 07/0091) and the Consejería de Salud (SAS 50/03). V.M.V. is the recipient of a contract from Instituto de Salud Carlos III (FIS, CP07/00171). CIBERehd and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición are funded by the Instituto de Salud Carlos III.

## References

- (1) Starzl, T. E., Demetris, A. J., and Van, T. D. (1989) Liver transplantation (1). *N. Engl. J. Med.* 321, 1014–1022.
- (2) Hofmann, A. F. (1984) Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* 4, 4S–14S.
- (3) Attili, A. F., Angelico, M., Cantafora, A., Alvaro, D., and Capocaccia, L. (1986) Bile acid-induced liver toxicity: Relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med. Hypotheses* 19, 57–69.
- (4) Greim, H., Trulzsch, D., Czygan, P., Rudick, J., Hutterer, F., Schaffner, F., and Popper, H. (1972) Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* 63, 846–850.
- (5) Lefkowitz, J. H., Arborgh, B. A., and Scheuer, P. J. (1980) Oxyphilic granular hepatocytes. Mitochondrion-rich liver cells in hepatic disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 74, 432–441.
- (6) Galle, P. R., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G., and Stiehl, A. (1990) Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 12, 486–491.
- (7) Sokol, R. J., Winklhofer-Roob, B. M., Devereaux, M. W., and McKim, J. M., Jr. (1995) Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109, 1249–1256.
- (8) Gumprich, E., Devereaux, M. W., Dahl, R. H., and Sokol, R. J. (2000) Glutathione status of isolated rat hepatocytes affects bile acid-induced cellular necrosis but not apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 102–111.
- (9) Patel, T., Bronk, S. F., and Gores, G. J. (1994) Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 94, 2183–2192.
- (10) Jones, B. A., Rao, Y. P., Stravitz, R. T., and Gores, G. J. (1997) Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 272, G1109–G1115.
- (11) Rodrigues, C. M., Fan, G., Ma, X., Kren, B. T., and Steer, C. J. (1998) A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J. Clin. Invest.* 101, 2790–2799.
- (12) Botla, R., Spivey, J. R., Aguilar, H., Bronk, S. F., and Gores, G. J. (1995) Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: A mechanism of UDCA cytoprotection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 930–938.
- (13) Yerushalmi, B., Dahl, R., Devereaux, M. W., Gumprich, E., and Sokol, R. J. (2001) Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 33, 616–626.
- (14) Alexander, B. (1998) The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition* 14, 376–390.
- (15) Clemens, M. G. (1999) Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 30, 1–5.
- (16) Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R., and Kim, Y. M. (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1075–1079.
- (17) Kim, Y. M., Chung, H. T., Simmons, R. L., and Billiar, T. R. (2000) Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* 275, 10954–10961.
- (18) Kim, Y. M., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272, 31138–31148.
- (19) Siendones, E., Fouad, D., Diaz-Guerra, M. J., De la Mata, M., Bosca, L., and Muntane, J. (2004) PGE1-induced NO reduces apoptosis by D-galactosamine through attenuation of NF-kappaB and NOS-2 expression in rat hepatocytes. *Hepatology* 40, 1295–1303.
- (20) Li, C. Q., and Wogan, G. N. (2005) Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* 226, 1–15.
- (21) Vieira, H., and Kroemer, G. (2003) Mitochondria as targets of apoptosis regulation by nitric oxide. *IUBMB Life* 55, 613–616.
- (22) Bucher, B. T., Feng, X., Jeyabalan, G., Zhang, B., Shao, L., Guo, Z., and Geller, D. A. (2007) Glycochenodeoxycholate (GCDC) inhibits cytokine induced iNOS expression in rat hepatocytes. *J. Surg. Res.* 138, 15–21.

- (23) Gumpricht, E., Dahl, R., Yerushalmi, B., Devereaux, M. W., and Sokol, R. J. (2002) Nitric oxide ameliorates hydrophobic bile acid-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes by non-mitochondrial pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 25823–25830.
- (24) Park, Y. C., Jun, C. D., Kang, H. S., Kim, H. D., Kim, H. M., and Chung, H. T. (1996) Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology* 87, 296–302.
- (25) Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A., and Murphy, M. P. (2001) Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: Antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* 276, 4588–4596.
- (26) Wardman, P. (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biol. Med.* 43, 995–1022.
- (27) LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231.
- (28) Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 6419.
- (29) Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138.
- (30) Granato, A., Gores, G., Vilei, M. T., Tolando, R., Ferraresso, C., and Muraca, M. (2003) Bilirubin inhibits bile acid induced apoptosis in rat hepatocytes. *Gut* 52, 1774–1778.
- (31) Patel, T., and Gores, G. J. (1997) Inhibition of bile-salt-induced hepatocyte apoptosis by the antioxidant lazaroid U83836E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 116–122.
- (32) Xiao, Z., Zhang, Z., Ranjan, V., and Diamond, S. L. (1997) Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J. Cell. Physiol.* 171, 205–211.
- (33) Spivey, J. R., Bronk, S. F., and Gores, G. J. (1993) Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J. Clin. Invest.* 92, 17–24.
- (34) Beuers, U., Nathanson, M. H., and Boyer, J. L. (1993) Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 104, 604–612.
- (35) Beuers, U., Throckmorton, D. C., Anderson, M. S., Isales, C. M., Thasler, W., Kullak-Ublick, G. A., Sauter, G., Koebe, H. G., Paumgartner, G., and Boyer, J. L. (1996) Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 110, 1553–1563.
- (36) Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G. A., Keppler, D., Paumgartner, G., and Dombrowski, F. (2001) Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 33, 1206–1216.
- (37) Rosado, J. A., Redondo, P. C., Salido, G. M., and Pariente, J. A. (2006) Calcium signalling and reactive oxygen species in non-excitabile cells. *Mini-Rev. Med. Chem.* 6, 409–415.
- (38) Hu, Q., Corda, S., Zweier, J. L., Capogrossi, M. C., and Ziegelstein, R. C. (1998) Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation* 97, 268–275.
- (39) Elliott, S. J., Doan, T. N., and Henschke, P. N. (1995) Reductant substrate for glutathione peroxidase modulates oxidant inhibition of Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 268, H278–H287.
- (40) Morales, S., Camello, P. J., Rosado, J. A., Mawe, G. M., and Pozo, M. J. (2005) Disruption of the filamentous actin cytoskeleton is necessary for the activation of capacitative calcium entry in naive smooth muscle cells. *Cell Signalling* 17, 635–645.
- (41) Törnquist, K., Vainio, P. J., Björklund, S., Titievsky, A., Dugué, B., and Tuominen, R. K. (2000) Hydrogen peroxide attenuates store-operated calcium entry and enhances calcium extrusion in thyroid FRTL-5 cells. *Biochem. J.* 351, 47–56.
- (42) Dionisio, N., Garcia-Mediavilla, M. V., Sanchez-Campos, S., Majano, P. L., Benedicto, I., Rosado, J. A., Salido, G. M., and González-Gallego, J. (2009) Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signaling alterations in hepatocytes. *J. Hepatol.* 50, 872–882.
- (43) Mitsuyama, T., Hidaka, K., Furuno, T., and Hara, N. (1998) Release of nitric oxide and expression of constitutive nitric oxide synthase of human endothelial cells: Enhancement by a 14-membered ring macrocyclic. *Mol. Cell. Biochem.* 181, 157–161.
- (44) Tran, Q. K., Ohashi, K., and Watanabe, H. (2000) Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 48, 13–22.
- (45) Ramasamy, S., Drummond, G. R., Ahn, J., Storek, M., Pohl, J., Parthasarathy, S., and Harrison, D. G. (1999) Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 56, 116–123.
- (46) Forman, H. J., and Fridovich, I. (1973) Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 396–400.
- (47) Huie, R. E., and Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res. Commun.* 18, 195–199.
- (48) Zhang, R., Min, W., and Sessa, W. C. (1995) Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 15320–15326.
- (49) Esposito, F., Ammendola, R., Faraonio, R., Russo, T., and Cimino, F. (2004) Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochem. Res.* 29, 617–628.
- (50) Sen, C. K., and Packer, L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10, 709–720.
- (51) Bernt, C., Vennegeerts, T., Beuers, U., and Rust, C. (2006) The human transcription factor AP-1 is a mediator of bile acid-induced liver cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 800–806.
- (52) Pusl, T., Vennegeerts, T., Wimmer, R., Denk, G. U., Beuers, U., and Rust, C. (2008) Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 208–212.

TX900327T



## Calcium-dependent nitric oxide production is involved in the cytoprotective properties of n-acetylcysteine in glycochenodeoxycholic acid-induced cell death in hepatocytes

Sandra González-Rubio<sup>a</sup>, Clara I. Linares<sup>a</sup>, Rosario I. Bello<sup>a</sup>, Raul González<sup>a,d</sup>, Gustavo Ferrín<sup>a,d</sup>, Ana B. Hidalgo<sup>a</sup>, Elisa Muñoz-Gomariz<sup>b</sup>, Blanca A. Rodríguez<sup>a</sup>, Pilar Barrera<sup>a,d</sup>, Isidora Ranchal<sup>a,d</sup>, Mario Durán-Prado<sup>c,e</sup>, Patricia Aguilar-Melero<sup>a</sup>, Manuel De la Mata<sup>a,d</sup>, Jordi Muntané<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Liver Research Unit, Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Department of Biostatistics, Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada, Spain

<sup>d</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd o Ciberehd)

<sup>e</sup> CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición CB06/03, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 July 2009

Revised 12 September 2009

Accepted 5 October 2009

Available online 23 October 2009

#### Keywords:

Cholestasis

Calcium mobilization

Free radicals

Antioxidants

Nitric oxide

NOS-3

### ABSTRACT

The intracellular oxidative stress has been involved in bile acid-induced cell death in hepatocytes. Nitric oxide (NO) exerts cytoprotective properties in glycochenodeoxycholic acid (GCDCA)-treated hepatocytes. The study evaluated the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  on the regulation of NO synthase (NOS)-3 expression during N-acetylcysteine (NAC) cytoprotection against GCDCA-induced cell death in hepatocytes. The regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pools (EGTA or BAPTA-AM) and NO (L-NAME or NO donor) production was assessed during NAC cytoprotection in GCDCA-treated HepG2 cells. The stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entrance was induced by A23187 in HepG2. Cell death,  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, NOS-1, -2 and -3 expression, AP-1 activation, and NO production were evaluated. GCDCA reduced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and NOS-3 expression, and enhanced cell death in HepG2. NO donor prevented, and L-NAME enhanced, GCDCA-induced cell death. The reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by EGTA, but not its release from intracellular stores by BAPTA-AM, enhanced cell death in GCDCA-treated cells. The stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entrance by A23187 reduced cell death and enhanced NOS-3 expression in GCDCA-treated HepG2 cells. The cytoprotective properties of NAC were related to the recovery of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, NOS-3 expression and NO production induced by GCDCA-treated HepG2 cells. The increase of NO production by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS-3 expression during NAC administration reduces cell death in GCDCA-treated hepatocytes.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Apoptosis is involved in the normal regulation of the organ size, as well as in the underlying mechanism of cell death in liver diseases. The induction of oxidative stress is a key event in the intracellular pathways leading to cellular apoptosis (Singh and Czaja, 2007).

**Abbreviations:** Activator protein 1, AP-1; Anion superoxide,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ; 2,7-dichlorofluorescein diacetate, DCFDA; (Z)-1-[2-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino] diazen-1-ium-1,2-diolate, NONOate; dihydroethidium, DHE; glycochenodeoxycholic acid, GCDCA; reduced glutathione, GSH; hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; lactate dehydrogenase, LDH; N (G)-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME; N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin, Ac-DEVD-AFC; N-acetylcysteine, NAC; Nitric oxide, NO; nitric oxide synthase, NOS; phosphate buffer solution, PBS; Reactive oxygen species, ROS; superoxide dismutase, SOD.

Corresponding author. Unidad de Investigación, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal s/n, E-14004 Córdoba, Spain. Fax: +34 957 010452.

E-mail address: [jordi.muntane.exts@juntadeandalucia.es](mailto:jordi.muntane.exts@juntadeandalucia.es) (J. Muntané).

Mitochondria or cytochrome P450-dependent metabolism are free radical generation sites related to the induction of cell death (Orrenius et al., 2007; Shiba and Shimamoto, 1999). The intense intracellular oxidative stress depletes cellular reduced glutathione (GSH) content during cell death (Nagai et al., 2002; Matsumaru et al., 2003). The accumulation of di-hydroxy-hydrophobic bile acids, such as the glycine conjugates of chenodeoxycholic acid (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA) in the liver is believed to play an important role in the pathogenesis of cholestatic liver injury (Attili et al., 1986; Greim et al., 1972). GCDCA induces cell death in cultured hepatocytes (Galle et al., 1990; Sokol et al., 1995; Patel et al., 1994; Jones et al., 1997). The involvement of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation has been determined during bile acid-induced apoptosis and necrosis in hepatocytes (Rodrigues et al., 1998; Botla et al., 1995; Yerushalmi et al., 2001).

The regulation of intracellular oxidative stress by antioxidants may determine cell fate and mode of cell death (Chandra et al., 2000). Different antioxidant strategies have been shown to be useful to



reduce oxidative stress and cell death in hepatocytes. GSH is the most abundant non-protein thiol present in mammalian cells. The highly reactive cysteine sulfhydryl residues allow GSH to be conjugated to toxic electrophiles by cellular GSH transferases. Additionally, GSH participates as a co-substrate in various GSH-dependent peroxidase reactions, protecting cells or tissues against oxidative damage by metabolizing toxic organic molecules and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). The maintenance of cellular GSH content prevents cell damage in different *in vivo* (Uedono et al., 1997) and *in vitro* (Colell et al., 1998) experimental models of hepatotoxicity. The administration of N-acetylcysteine (NAC), an excellent source of intracellular cysteine and free radical scavenger, has been shown to have clinical applications in HIV infection, cancer, heart disease, as well as in smoking, kidney and liver diseases (Kelly, 1998).

Nitric oxide (NO) exerts a key role on the hepatic metabolism and liver injury induced by different agents (Alexander, 1998; Clemens, 1999). The three described nitric oxide synthase (NOS) isoforms are present in the liver, being the inducible (iNOS or NOS-2) and endothelial constitutive (eNOS or NOS-3) forms the most abundant ones (Clemens, 1999). The expression of the neuronal constitutive (nNOS, NOS-1) form is limited to the nervous terminations of the liver blood vessels (Clemens, 1999). NO has been shown to exert pro-apoptotic and anti-apoptotic effect in cultured hepatocytes (Chung et al., 2001; Kim et al., 2000; Kim et al., 1997; Siendones et al., 2004). The beneficial properties may be explained by its capacity to stimulate cGMP production, caspase nitrosylation, inhibition of Bid cleavage and translocation to mitochondria, and inhibition of the mitochondria permeability transition (Chung et al., 2001). The pro-apoptotic properties of NO are associated to alteration of mitochondrial potential and release of apoptotic factors, p53 activation, alteration of bcl-2 expression and ceramide production upon caspase-3 activation (Li and Wogan, 2005; Vieira and Kroemer, 2003).

Reactive oxygen and nitrogen species may act as intracellular messengers in normal cell functions. However, the induction of oxidative stress is related to  $Ca^{2+}$  signaling disturbances, alteration of cell function and cell death in different diseases and chemical toxicity (Ermak and Davies, 2002; Nicotera and Orrenius, 1998). The induction of cell death by GCDCA has been related to alteration of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in hepatocytes (Spivey et al., 1993). In addition, several reports have shown that the elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration increased NOS-2 gene and/or protein expression and subsequent NO production (Park et al., 1996). In this sense, the hypothesis of the study was the potential restoration of  $Ca^{2+}$  disturbances and NO-dependent cell signaling by antioxidant therapy during GCDCA-induced cell death in HepG2 cells. The aim of the present study was the identification of the role of  $Ca^{2+}$  entrance, or its release from intracellular stores, on the expression of NOS-3 and cell death in GCDCA-treated hepatocytes. In addition, we assessed if the reduction of oxidative stress and cytoprotective properties by NAC were related to the alteration to intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and NOS-3 expression in GCDCA-treated hepatocytes.

## Experimental procedures

**Cell culture.** HepG2 cells (human hepatoma) were obtained from the NIH ATCC repository (Bethesda, MD) and maintained in Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) (M0643, Sigma-Aldrich) culture medium supplemented with sodium pyruvate (1 mM),  $NaHCO_3$  (2.2 g/l), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), amphotericin B (0.25  $\mu$ g/ml) and 10 % fetal bovine serum (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) for 48 h before induction of cell death by GCDCA (500  $\mu$ M). An extracellular (EGTA, 3 mM), or intracellular (BAPTA-AM, 10  $\mu$ M)  $Ca^{2+}$  chelator were pre-administered (2 h) to GCDCA-treated hepatocytes in order to evaluate their involvement on

cell death and NOS-3 expression. BAPTA-AM is a cell-permeable derivative which became active upon intracellular activation by esterase. The extracellular  $Ca^{2+}$  entrance was induced by A23187 (0.5  $\mu$ M) co-administered with GCDCA in HepG2 cells. The NOS inhibitor N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0.5 mM) or NO donor (Z)-1-[2-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate (NONOate, 0.3 mM) were pre-administered (2 h) to GCDCA-treated hepatocytes. NAC (0.5 mM) was co-administered with GCDCA in HepG2 cells (Sinbandhit-Tricot et al., 2003; Zaragoza et al., 2001).

**Measurement of ROS production.** ROS were detected using 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA; Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands) dye in hepatocytes. The production of anion superoxide ( $O_2^-$ ) was monitored using dihydroethidium (DHE; Molecular Probes) probe in hepatocytes. Hepatocytes were incubated with DHE (10  $\mu$ M) or DCFDA (2  $\mu$ M) for 20 and 30 min, respectively. Cells were treated with digitonin (10  $\mu$ M) for 5 min in order to eliminate probe not retained in mitochondria. The culture medium was removed and replaced with PBS in order to avoid any interference with the measurement of cell fluorescence. The fluorescence emitted by DHE (Ex 510, Em 590) and DCFDA (Ex 500, Em 520) was assessed *in situ* using a GENios Microplate Reader (TECAN).

**Preparation of the cytoplasm and nuclear extracts.** The cytoplasm and nuclear fractions were obtained through cell fractionation (Schreiber et al., 1989). Briefly, hepatocytes ( $3 \times 10^6$ ) were treated with lysis buffer (300  $\mu$ l) containing 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 0.6% Nonidet NP-40 for 10 min on ice. Afterwards, samples were homogenized and centrifuged at  $15,000 \times g$  for 3 min at 4 °C. Aliquots of the supernatant (cytoplasm) were stored at  $-80$  °C until use for the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) release and caspase-3-associated activity. After removal the cytoplasmic fraction, the nuclear pellet was resuspended in 50  $\mu$ l of nuclear extraction buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM DTT). The tube was incubated for 20 min on ice with continuous mixing and centrifuged at  $15,000 \times g$  for 5 min at 4 °C. Aliquots of the supernatant (nuclear fraction) were stored at  $-80$  °C until use for the measurement of AP-1 expression.

**Measurement of LDH release.** LDH in the culture medium (130  $\mu$ l) and cytoplasm (5  $\mu$ l) was assessed with 0.2 mM  $\beta$ -NADH and 0.4 mM pyruvic acid up to 200  $\mu$ l PBS pH 7.4. LDH concentration in the sample was proportional to the rate of NADH oxidation measured by the absorbance at 334 nm (OD/min) using a GENios Microplate Reader (TECAN). LDH concentration in the cytoplasm and culture medium was calculated using a commercial standard (GE Healthcare). The LDH release (%) was calculated as the ratio [(LDH culture medium) / (LDH cytoplasm + LDH culture medium)]  $\times$  100.

**Measurement of NO production.** NO was assessed by the quantification of its related end products, nitrite + nitrate. In the assay, nitrate was converted to nitrite by nitrate reductase (EC 1.6.6.2) and total nitrite was measured using the Griess reaction (Green et al., 1982). Briefly, the samples were incubated with 0.2 U/ml nitrate reductase, 5 mM FAD and 50 mM NADPH at 37 °C for 20 min. The reaction was stopped by the addition of 10 mM sodium pyruvate and 24 mg/ml LDH at 37 °C for 5 min, and precipitated with 1.4%  $ZnSO_4$ . Total nitrite reacted with Griess reagent (1% sulphanilamide, 2.5%  $PO_4H_3$  and 0.1% n-naphthyl-ethylene-diamine) at 37 °C for 10 min and it was read using the 540-nm filter in a titrated Organon Teknika 510 ELISA reader.

### Measurement of free cytosolic calcium concentration in single cells.

The free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was determined with the fluorescent calcium indicator fluo4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). HepG2 cells (15000 cells/cm<sup>2</sup>) were incubated with supplemented EMEM (without fetal bovine serum) plus 2.5  $\mu\text{M}$  fluo4-AM and 0.02% pluronic acid (stock solution  $\times 1000$  in  $\text{Me}_2\text{SO}$ ) for 30 min. BAPTA-AM were co-administered with fluo4-AM in hepatocytes. After loading, the cells were washed in phosphate buffer solution (PBS) (to remove any dye nonspecifically associated with the cell surface) and added fresh media including treatments (EGTA, BAPTA-AM, NAC and/or GCDCA when required). Fluorescence images were collected with a Nikon Eclipse TE2000 E microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and the signal (Ex 488 nm, Em 543 nm) processed by the MetaFluor Software (Imaging Corp., West Chester, PA, USA).

### Total RNA isolation and quantitative real-time RT-PCR procedure.

Total RNA from HepG2 cells was extracted using Trisure (Bioline, London, UK) reagent according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies Inc.). RNA was precipitated using ice-cold isopropanol, washed with 75% ethanol and resuspended in RNase-free water (Sigma). RNA was treated with DNase I (Promega, Madison, WI, USA) (1 IU/ $\mu\text{g}$  RNA) at 37 °C for 30 min. DNase I was degraded at 65 °C for 10 min. The integrity of RNA was verified following separation by electrophoresis on 0.8% agarose gel containing 0.5% (v/v) ethidium bromide.

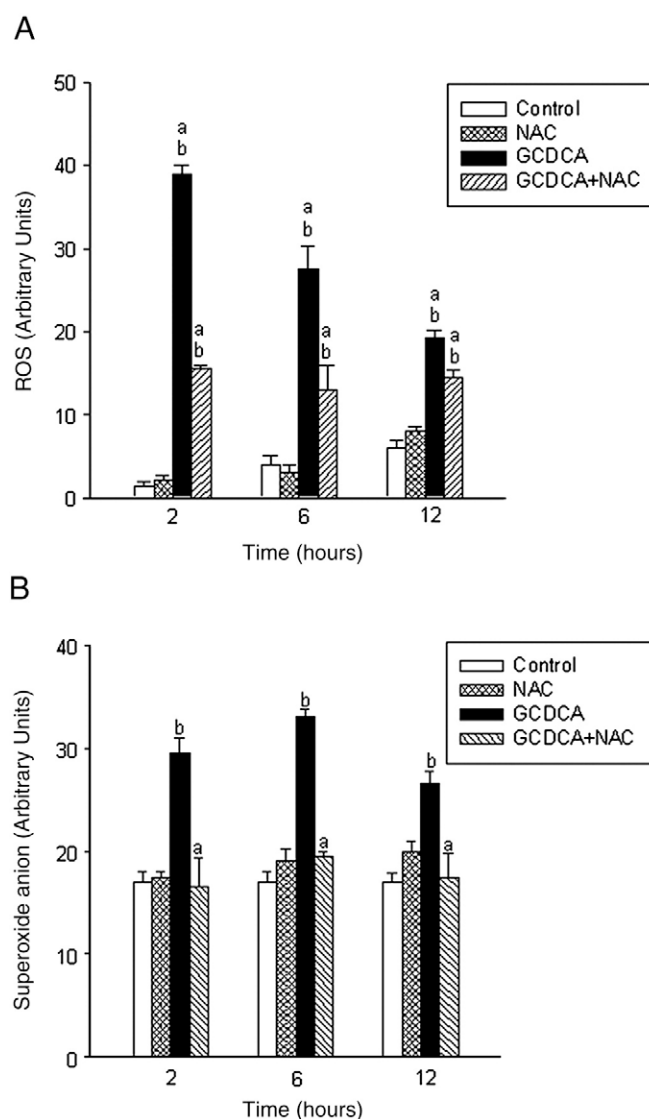
The expression of mRNA for NOS-1, NOS-2 and NOS-3 was examined by quantitative real-time RT-PCR using the LightCycler thermal cycler system (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA). RT-PCR was performed in one step, using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was performed with 5 ng/ $\mu\text{l}$  of total RNA diluted in reaction mixture including Omniscript and Sensiscript Reverse Transcriptase, as well as the specific sets of primers for human NOS-1 (sense, 5 - CCCCA CCTCA GGAAA ACAGT C-3', and antisense, 5 -CTCTG TGTCC TTGAG CTGGT AAG-3'), NOS-2 (BIOSOURCE, Nivelles, Belgium) (Catalog number GH00144, cDNA reference GenBank U05810) and NOS-3 (sense, 5 -AGGGC GACAT GGAGC TGGAC GAG-3', and antisense, 5 -GTGTC TGAGC CGGGA GGGTC GAA-3') and 18S (MVG-Biotech AG, Getotek, Sabadell, Spain) (sense, 5 -GTAAC CCGTT GAAC CCATT-3', and antisense, 5 -CCATC CAATC GGTAG TAGCG-3').

The RT conditions were 20 min at 55 °C and 15 minutes at 95 °C. The amplification protocol consisted of 50 cycles of incubation after initial denaturation at 95 °C for 20 s (20 °C/s), 60 °C for 20 s (20 °C/s) and 72 °C for 25 s (2 °C/s). The melting conditions were fixed at 65 °C (0.1 °C/s). To confirm amplification specificity, the amplified fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide, the PCR products were subjected to a melting curve analysis, and negative and positive controls containing either RNase-free water or control positive solution (BIOSOURCE) instead of sample were run to confirm that the samples were not cross-contaminated. Quantitation of relative expression was determined by the  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  method.

**NOS-3 expression.** NOS-3 expression was assessed by Western-blot analysis in cytoplasm fraction. Proteins (50  $\mu\text{g}$ ) were separated by 6% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The membranes were incubated with the corresponding primary rabbit polyclonal (1/1000) (sc-654, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA) antibodies, and secondary goat anti-rabbit polyclonal (1/50000) (sc-2301, Santa Cruz Biotechnology, Inc.,) antibodies coupled to horseradish peroxidase, revealing the protein content by commercial enhanced chemiluminescence (ECL) assay (RPN2135, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).  $\beta$ -actin, used as internal protein loading, was identified with commercial rabbit polyclonal antibodies (1/5000)

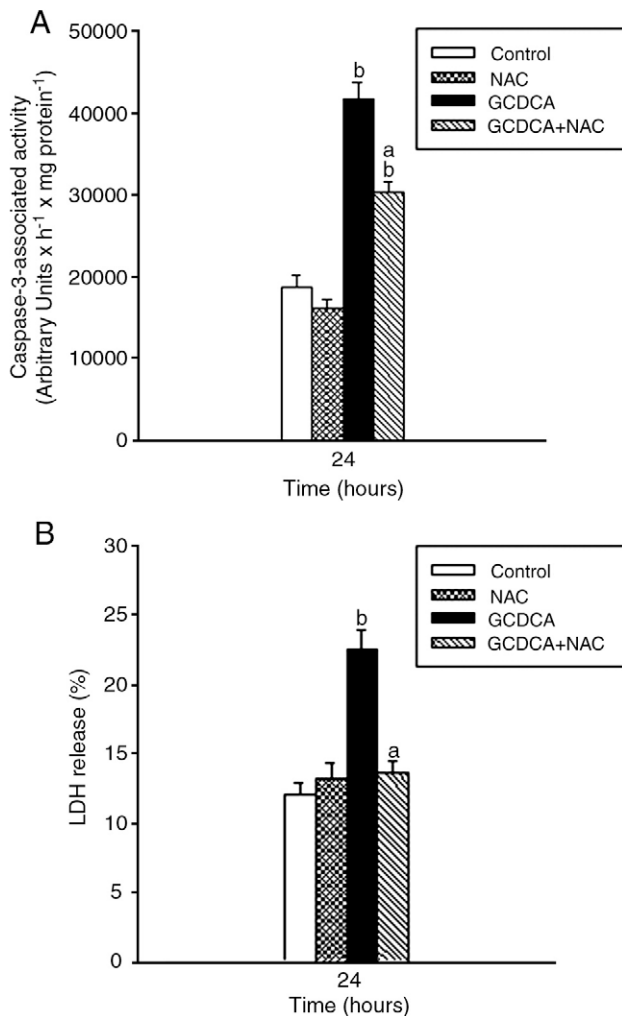
(ab8227, Abcam, Cambridge, UK). A purified commercial NOS-3 (Catalog number 360880, Cayman, Ann Arbor, MI, USA) protein was used as standard.

**AP-1 expression.** Activator protein 1 (AP-1) expression in nuclear extract was evaluated by radioactive electrophoretic mobility shift assay (EMSA). AP-1 consensus oligonucleotides 5 -CGCTTGATGAGT-CAGCCGGAA-3' and 3 -GCGAACTACTCAGTCGGCCTT-5' (Promega, Madison, USA) were used. Probes were labeled at the 5' end with T4 polynucleotide kinase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Excess unreacted ATP was separated from the labeled probe using MicroSpin™ G25 columns (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA). Binding reaction (25  $\mu\text{l}$ ) contained 15  $\mu\text{g}$  protein,



**Fig. 1.** Effect of N-acetylcysteine (NAC) on the production of reactive oxygen species (ROS) in glycochenodeoxycholate (GCDCA)-treated HepG2 cells. The production of ROS (A) and superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) (B) was determined at 2, 6 and 12 h after induction of cell cytotoxicity by GCDCA (0.5 mM) in HepG2. NAC (0.5 mM) was co-administered to GCDCA-treated HepG2 cells. ROS and anion superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) were determined by 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and dihydroethidium (DHE) dyes following the procedure described in Materials and methods. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs. the corresponding control group with GCDCA. The groups with "b" were significantly different vs. the corresponding control group without GCDCA.

5  $\mu$ l incubation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM  $MgCl_2$  and 20% glycerol) and 1  $\mu$ g poly(dI-dC) (Promega). Samples were incubated for 15 min on ice and added the corresponding amount of  $^{32}P$ -labeled probe. Samples were incubated for 15 min at room temperature and loaded on 6% native polyacrylamide gel electrophoresis. Gels were fixed (30% methanol, 10% glacial acetic acid) and dried at 90 °C under vacuum. Dried gels were visualized by autoradiography (Hyperfilm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The identification of AP-1 complex was carried by incubation of the mixture with affinity-purified polyclonal antibodies against c-jun and c-fos (4  $\mu$ g/ml) subunit (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 1 h on ice before  $^{32}P$ -labeled probe addition. The use of affinity-purified polyclonal antibodies against c-jun and c-fos reduced the expression of AP-1 expression in control sample (Fig. 3C). A competitive assay was also carried out by incubating the mixture with cold probe (100-fold excess) for 1 h on ice before  $^{32}P$ -labeled probe addition. The competitive assay using an excess of



**Fig. 2.** Effect of N-acetylcysteine (NAC) on caspase-3-associated activity (A) and lactate dehydrogenase (LDH) release (B) in glycochenodeoxycholate (GCDCA)-treated HepG2 cells. NAC (0.5 mM) was co-administered to GCDCA-treated HepG2 cells. Caspase-3-associated activity was assessed using acid-N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (Ac-DEVD-AFC) as the corresponding peptide-based substrates. LDH release represents the percentage of LDH in the culture medium in relation to total LDH. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs. the corresponding control group with GCDCA. The groups with "b" were significantly different vs. the corresponding control group without GCDCA.

**Table 1**

Effect of N-acetylcysteine (NAC) on the concentration of nitric oxide (NO)-end products in glycochenodeoxycholate (GCDCA)-treated HepG2 cells.

Treatments	NO-end products ( $\mu$ M)
Control	9.5 $\pm$ 0.20
NAC	11.1 $\pm$ 0.91
GCDCA	6.1 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
GCDCA + NAC	8.1 $\pm$ 0.65 <sup>a,b</sup>

NAC was co-administered to GCDCA-treated HepG2 cells. The nitrite + nitrate concentration in culture medium was determined by the Griess reaction as described in Materials and methods. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs. the corresponding control group with GCDCA. The groups with "b" were significantly different vs. the corresponding control group without GCDCA.

cold probe abolished the radioactive signal of AP-1 in control sample (Fig. 3C).

**Statistical analysis.** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of five experiments. The studied variables are quantitative, and followed a normal distribution according to the Shapiro-Wilk test. The data of ROS (Fig. 1A) and  $O_2^{\cdot-}$  (Fig. 1B) were analyzed by three-way ANOVA, using GCDCA, NAC and time as the three independent variables. The data of caspase-3 (Fig. 2A), LDH (Fig. 2B), NOS-3 expression (Fig. 3) and nitrite + nitrate (Table 1) were assessed by two-way ANOVA using GCDCA and NAC as the two independent variables. The comparisons of overall means from main effects were only evaluated in the absence of interactions among independent variables. By contrast, the means were compared in each category in the presence of interaction among independent variables. In both situations, the comparisons were carried out using the Sidak adjustment as a *post-hoc* multiple comparison analysis. The effect of NONOate and L-NAME on caspase-3-associated activity (Table 2), as well as the effect of EGTA, BAPTA and A23187 on caspase-3-associated activity (Table 3) and NOS-3 expression (Table 3) in GCDCA-treated hepatocytes was assessed by one-way ANOVA due to the absence of all possible combinations of the factors. The homogeneity of variances was assessed by Levene's test. The data were submitted to the one-way ANOVA analysis in order to determine the overall differences among the groups. The Student-Newman-Keuls and C de Dunnet have been used as *post-hoc* multiple comparison analysis according to the homogeneity of variances. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs. the corresponding control

**Table 2**

Effect of an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) and nitric oxide (NO) donor on the caspase-3-associated activity in glycochenodeoxycholate (GCDCA)-treated HepG2 cells.

Treatments	Caspase-3-associated activity (Arbitrary Units $\times$ h <sup>-1</sup> $\times$ mg protein <sup>-1</sup> )
Control	11581 $\pm$ 1800.0
NONOate	10480 $\pm$ 1650.4
L-NAME	10364 $\pm$ 2252.1
GCDCA	62442 $\pm$ 12271.3 <sup>b</sup>
GCDCA + NONOate	26397 $\pm$ 4775.2 <sup>a,b</sup>
GCDCA + L-NAME	275965 $\pm$ 15822.5 <sup>a,b</sup>

N (G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and (Z)-1-[2-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate (NONOate) were used as NOS inhibitor and NO donor, respectively. L-NAME and NONOate were administered 2 h before GCDCA in HepG2. Caspase-3-associated activity was assessed using acid-N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (Ac-DEVD-AFC) as the corresponding peptide-based substrates. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs. the corresponding control group with GCDCA. The groups with "b" were significantly different vs. the corresponding control group without GCDCA.

**Table 3**

Effect of an extracellular and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelator, and  $\text{Ca}^{2+}$  agonist on the caspase-3-associated activity and mRNA nitric oxide synthase (NOS)-3 expression in glycochenodeoxycholate (GCDCA)-treated HepG2 cells.

Treatments	Caspase-3-associated activity (Arbitrary Units $\times$ h <sup>-1</sup> $\times$ mg protein <sup>-1</sup> )	NOS-3 expression (%)
Control	7667 $\pm$ 5314.6	100 $\pm$ 1.0
EGTA	5744 $\pm$ 5586.3	62 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>
BAPTA-AM	4699 $\pm$ 1208.5	102 $\pm$ 4.2
A23187	13054 $\pm$ 2637.3 <sup>b</sup>	114 $\pm$ 6.0
GCDCA	62070 $\pm$ 9791.1 <sup>b</sup>	60 $\pm$ 6.0 <sup>b</sup>
GCDCA + EGTA	298733 $\pm$ 39057.0 <sup>a,b</sup>	59 $\pm$ 7.5
GCDCA + BAPTA-AM	64253 $\pm$ 9235.8 <sup>b</sup>	55 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>
GCDCA + A23187	16875 $\pm$ 1757.4 <sup>a</sup>	117 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>

EGTA (3 mM) or BAPTA-AM (10  $\mu$ M) were pre-administered to GCDCA-treated HepG2. A23187 (0.5  $\mu$ M) was co-administered to GCDCA-treated HepG2 cells. Caspase-3-associated activity was assessed using acid-N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (Ac-DEVD-AFC) as the corresponding peptide-based substrates. The mRNA expression was determined by quantitative RT-PCR using the procedure and the primers described in Materials and methods. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs. the corresponding control group with GCDCA. The groups with "b" were significantly different vs. the corresponding control group without GCDCA.

group with GCDCA. The groups with "b" were significantly different vs. the corresponding control group without GCDCA. The commercial software SPSS v. 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois, USA) was used for the statistical analysis.

## Results

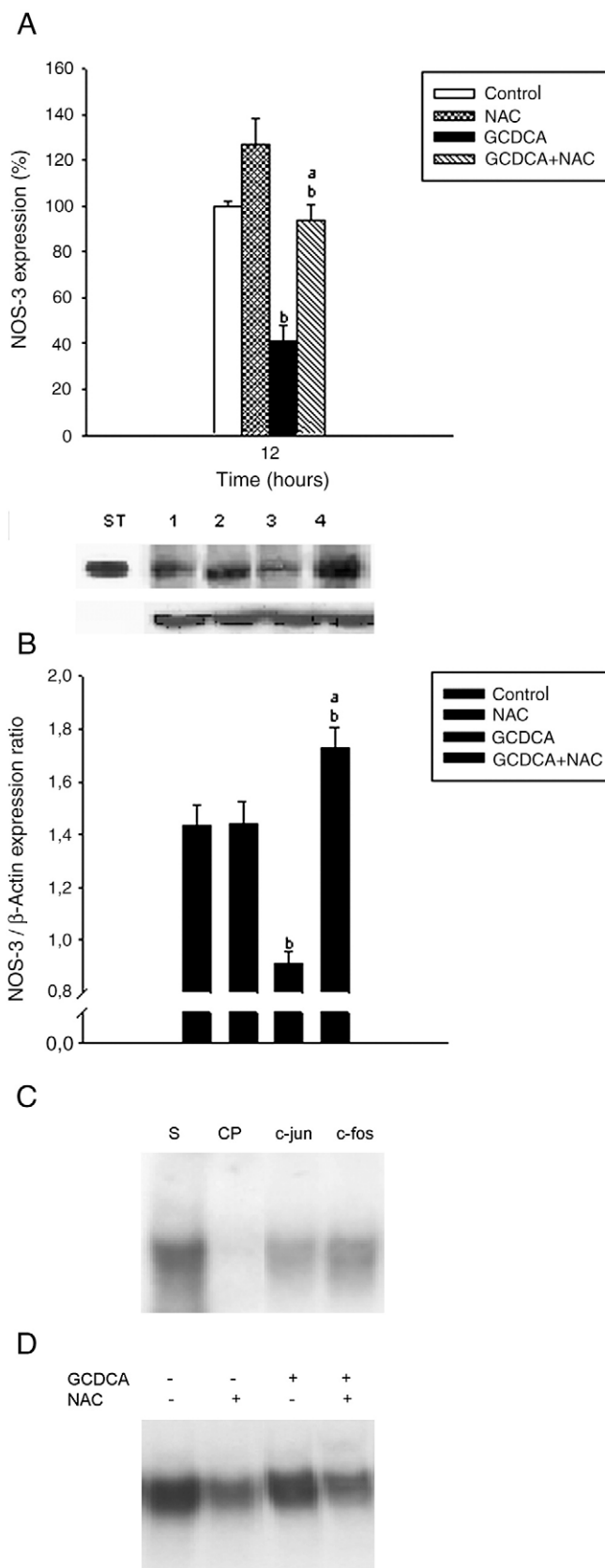
### NAC reduced oxidative stress and cell death induced by GCDCA

The hepatocellular injury induced by GCDCA is associated to ROS production in hepatocytes (Rodrigues et al., 1998; Botla et al., 1995). GCDCA induced a sharp increase of ROS at 2 h ( $p \leq 0.000$ ), 6 h ( $p \leq 0.000$ ), and 12 h ( $p \leq 0.000$ ) in hepatocytes (Fig. 1A). The production of ROS by GCDCA declined from 2 to 12 h in hepatocytes ( $p \leq 0.000$ ; mean difference: 19.75; C.I. 95% 13.35–26.15) (Fig. 1A). The production of  $\text{O}_2^-$  was not significantly altered overtime (Fig. 1B). GCDCA increased  $\text{O}_2^-$  production (Fig. 1B,  $p \leq 0.000$ ). The co-administration of NAC reduced ROS and  $\text{O}_2^-$  production in GCDCA-treated hepatocytes (Figs. 1A and B) ( $p \leq 0.000$  at 2 h). The kinetic comparison between the Figs. 1A and B showed that the beneficial properties of NAC against  $\text{O}_2^-$  production was more sustained than that observed with the DCFDA-reacting ROS in hepatocytes. The co-administration of NAC reduced caspase-3 activity (Fig. 2A) and hepatocellular necrosis (Fig. 2B) induced by GCDCA in HepG2 ( $p \leq 0.005$ ).

**Fig. 3.** Effect of N-acetylcysteine (NAC) on nitric oxide synthase (NOS)-3 and activator protein-1 (AP-1) expression in glycochenodeoxycholate (GCDCA)-treated HepG2 cells. NAC (0.5 mM) was co-administered to GCDCA-treated HepG2 cells. The mRNA expression (A) was determined by quantitative RT-PCR using the procedure and the primers described in Materials and methods. The NOS-3 protein expression (B) was assessed by SDS electrophoresis coupled to Western-blot analysis (line 1: control, line 2: NAC, line 3: GCDCA and line 4: GCDCA + NAC). A purified commercial NOS-3 protein was used as standard (ST) in the image.  $\beta$ -actin was used as internal protein loading. The expression of AP-1 in nuclear fraction was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (D). A preliminary competitive study was carried out using cold probe (CP), anti-c-jun and anti-c-fos antibodies to identify the AP-1 complex in control (S) sample (C). The statistical analysis of densitometric values of the spots is shown below each blot. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of five independent experiments. The statistical differences were set at  $p \leq 0.05$ . The groups with "a" were significantly different vs. the corresponding control group with GCDCA. The groups with "b" were significantly different vs. the corresponding control group without GCDCA. The images were representative of 4 independent experiments.

### Role of NOS-3 in GCDCA-treated hepatocytes

NO is mainly produced by NOS-2 and NOS-3 in hepatocytes (Clemens, 1999). We were not able to detect a reliable NOS-1 and



NOS-2 mRNA and protein expression in HepG2. But, NOS-3 mRNA and protein content were systematically detected in HepG2 cells. GCDCA reduced the cytokine-dependent induction of NOS-2 expression and NO production in cultured rat hepatocytes (Bucher et al., 2007). The induction of hepatocellular injury by GCDCA (Fig. 2) was related to a reduction of NOS-3 mRNA (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) expression ( $p \leq 0.001$ ), as well as NO production (Table 1) in HepG2 ( $p \leq 0.006$ ). In concordance with Bucher et al. (2007), the exogenous NO supplementation with NONOate prevented caspase-3 activity (Table 2,  $p \leq 0.05$ ) induced by GCDCA in hepatocytes. The pre-administration of the NOS inhibitor, L-NAME, enhanced caspase-3 activity in GCDCA-treated hepatocytes (Table 2) ( $p \leq 0.000$ ). The administration of NAC increased NOS-3 mRNA (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) expression ( $p \leq 0.002$ ), and NO production (Table 1,  $p \leq 0.05$ ) in GCDCA-treated HepG2. AP-1 and antioxidant response elements are involved in the regulation of NOS-3 gene (Zhang et al., 1995). NAC reduced the expression of AP-1 in nuclear fractions from control and GCDCA-treated hepatocytes (Fig. 3D).

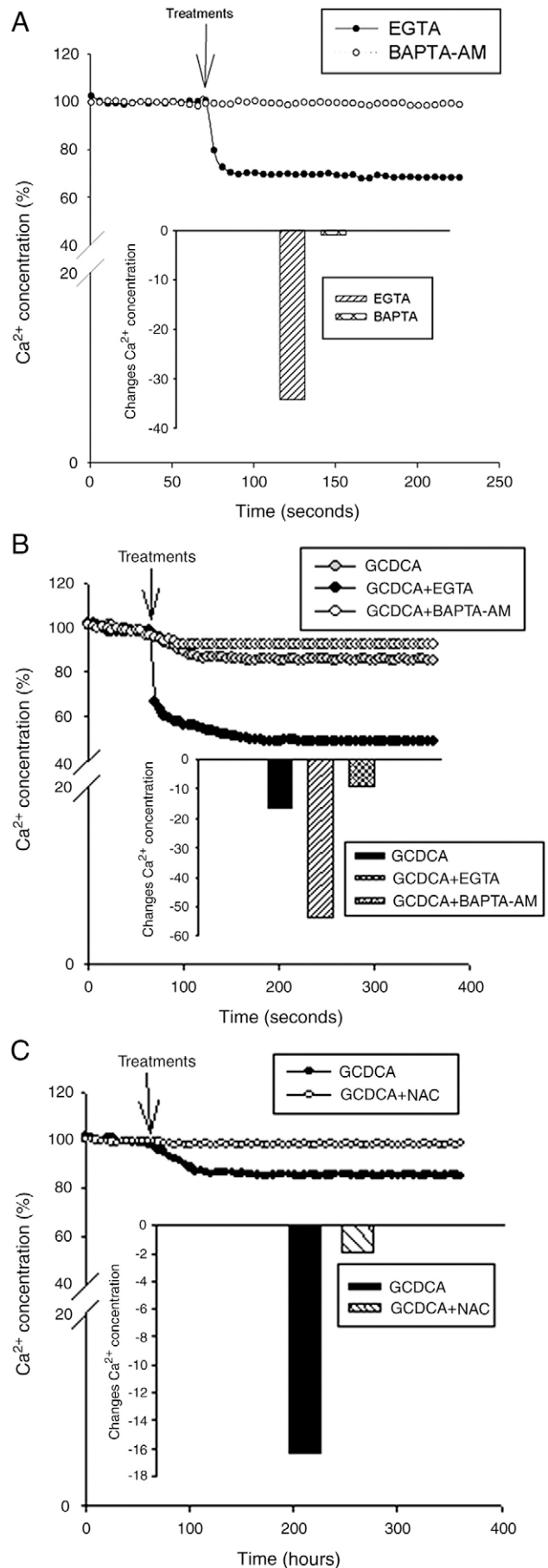
#### Role of $Ca^{2+}$ in GCDCA-treated hepatocytes

The induction of apoptosis by glycodeoxycholate has been associated to an increase of the intracellular concentration of  $Mg^{2+}$  but not  $Ca^{2+}$  (Patel et al., 1994), and PKC activation (Jones et al., 1997) in hepatocytes. EGTA, but not BAPTA-AM, reduced the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in hepatoma cells (Fig. 4A). GCDCA also induced a transient reduction of the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in HepG2 (Fig. 4B). The administration of an extracellular  $Ca^{2+}$  chelator (EGTA), but not intracellular  $Ca^{2+}$  chelator (BAPTA-AM), enhanced caspase-3 activity in GCDCA-treated hepatocytes (Table 3) ( $p \leq 0.05$ ). The intracellular  $Ca^{2+}$  concentration is important for the expression of NOS-2 in inflammatory cells (Park et al., 1996). The reduction of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration drastically reduced the increase of NOS-3 expression induced by shear stress in endothelial cells (Xiao et al., 1997). Therefore, the inhibition of  $Ca^{2+}$  entrance by EGTA, but not BAPTA-AM, reduced NOS-3 expression in control cells (Table 3) ( $p \leq 0.05$ ). The administration of NAC prevented the reduction of  $Ca^{2+}$  entrance induced by GCDCA in hepatocytes (Fig. 4C). Then, the cytoprotective properties of NAC (Fig. 2) were related to the prevention of GCDCA-induced intracellular  $Ca^{2+}$  (Fig. 4C) and NOS-3 expression (Fig. 3) reduction in HepG2. The administration of an agonist of cellular  $Ca^{2+}$  entrance, such as A23187, reduced caspase-3 activity ( $p \leq 0.05$ ) and enhanced ( $p \leq 0.000$ ) NOS-3 expression in GCDCA-treated HepG2 cells (Table 3).

#### Discussion

The accumulation of toxic hydrophobic bile acid induces cell injury in hepatocytes. The study showed the important role of  $Ca^{2+}$  and NOS-3 expression during cell death induced by GCDCA in HepG2. The cytoprotective properties of NAC administration were related to the recovery of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and NOS-3 expression in GCDCA-treated HepG2 cells.

The exposure of hydrophobic bile acids has been associated to the induction of apoptosis in hepatocytes (Galle et al., 1990; Sokol et al., 1995; Patel et al., 1994; Jones et al., 1997). Patel et al. (Patel et al., 1994) have shown that the initial onset of apoptosis by low concentration of GCDCA (50  $\mu$ M) is related to an increase of cytosolic



**Fig. 4.** Regulation of the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration by  $Ca^{2+}$  chelators in control (A) and glycodeoxycholate (GCDCA)-treated (B) cells, as well as by N-acetylcysteine (NAC) (C) in GCDCA-treated HepG2 cells. EGTA (3 mM) or NAC (0.5 mM) was co-administered to GCDCA-treated HepG2 cells. BAPTA-AM (10  $\mu$ M) was pre-administered (30 min) to GCDCA-treated HepG2 cells. The intracellular  $Ca^{2+}$  concentration was determined with the fluorescent calcium indicator fluo4-AM by confocal microscopy as described in Materials and methods. The images are representative of 4 independent experiments.

free  $Mg^{2+}$  without changes in basal  $Ca^{2+}$  concentration. Nevertheless, the hepatocellular necrosis induced by high concentration of GCDCA (250  $\mu M$ ) is related to mitochondrial dysfunction, ATP depletion, and sustained raise of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in rat hepatocytes (Bucher et al., 2007). In our conditions, GCDCA induced a transient reduction of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. The entrance of extracellular  $Ca^{2+}$ , but not intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization, appeared as an essential requirement for the survival of control HepG2 cells. The administration of an extracellular  $Ca^{2+}$  chelator such as EGTA, but not the intracellular one BAPTA-AM, reduced intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and enhanced caspase-3 activity in GCDCA-treated cells. The induction of apoptosis by GCDCA has been related to the activation and translocation to cell membrane of protein kinase C (PKC)- $\alpha$ , - $\delta$  and - $\zeta$  in GCDCA-treated hepatocytes (Jones et al., 1997). Nevertheless, other studies showed that taurochenodeoxycholic acid induces selective translocation of PKC- $\delta$ , but not PKC- $\alpha$ , - $\delta$  and - $\zeta$  to hepatocellular membrane (Beuers et al., 1999). The administration of beneficial agents for the treatment of cholestatic disorders, such as tauroursodeoxycholic acid and its hydrophobic 7 $\alpha$ -hidroxi epimer or taurochenodeoxycholic acid, enhanced intracellular  $Ca^{2+}$  concentration (Beuers et al., 1993) through  $Ni^{2+}$ -sensitive  $Ca^{2+}$  channels, with translocation of PKC- $\alpha$  to cell membrane in cultured hepatocytes (Beuers et al., 1996). Beuers et al. (Beuers et al., 2001) showed that the beneficial properties of ursodeoxycholic acid may be related to enhanced vesicular exocytosis by  $Ca^{2+}$ -dependent PKC activation in plasma membrane.

The involvement of mitochondria and ROS production has also been clearly demonstrated in GCDCA-treated hepatocytes (Rodrigues et al., 1998; Botla et al., 1995; Yerushalmi et al., 2001). ROS are mediators in the alteration of calcium homeostasis, which precedes other morphological and functional alterations of the cells (Rosado et al., 2006). The induction of oxidative stress is related to  $Ca^{2+}$  signaling disturbances, alteration of cell function and cell death in different diseases and chemical toxicity (Ermak and Davies, 2002; Nicotera and Orrenius, 1998). Low concentrations (1–10  $\mu M$ ) of  $H_2O_2$  exhibit no effect on cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration, while 100  $\mu M$   $H_2O_2$  induced intracellular oscillations in human aortic endothelial cells (Hu et al., 1998). The induction of ROS by NSA and core proteins altered  $Ca^{2+}$  entry and extrusion by the plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase in Huh7-transfected cells (Dionisio et al., 2009). The study showed that the induction of ROS production was associated to a reduction of  $Ca^{2+}$  entrance during GCDCA-induced cytotoxicity in HepG2 cells.

The induction of oxidative stress is generally related to a depletion of intracellular reduced glutathione (GSH) content during cell death (Nagai et al., 2002; Matsumaru et al., 2003). The maintenance of mitochondrial GSH content prevents cells damage in different experimental models of hepatotoxicity (Uedono et al., 1997; Colell et al., 1998). The administration of NAC reduced oxidized/reduced GSH ratio and cell death in D-galactosamine-treated human hepatocytes (González et al., 2009). The reduction of ROS production by NAC was related to a recovery of  $Ca^{2+}$  entrance, a raise of NOS-3 expression and reduction of cell death in GCDCA-treated HepG2 cells. The association between  $Ca^{2+}$  and NOS-3 expression was further confirmed with the reduction of NOS-3 expression by EGTA in HepG2.  $Ca^{2+}$  regulates NOS-3 expression (Mitsuyama et al., 1998) and activation (Tran et al., 2000) in endothelial cells. NAC increases NOS-3 mRNA and protein expression in endothelial cells (Ramasamy et al., 1999). It is feasible that NAC may increase NOS activity by stabilization of its dimeric form, as well as prolong functional NO half-life due to its ROS scavenging-dependent activity. However, the kinetic constants suggest that the rate of reactions between common antioxidants and  $O_2^{\cdot -}$  is much slower than the rate of the reaction between  $O_2^{\cdot -}$  and NO (Forman and Fridovich, 1973; Huie and Padmaja, 1993). This raises the possibility that antioxidants may have other effects on NO pathway beyond scavenging  $O_2^{\cdot -}$  with extension of NO half-life. The present

study suggests that NAC recovered the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and enhanced NOS-3 expression in GCDCA-treated HepG2 cells. The promoter of human NOS-3 gene contains simian virus 40 promoter factor 1 (Sp-1), AP-1 and antioxidant response elements (Zhang et al., 1995), all of which are regulated by cellular redox state (Esposito et al., 2004; Sen and Packer, 1996). The deletion of AP-1 sequence (–1600 to –1300 bp) increased the promoter NOS-3 activity (Zhang et al., 1995). Bernt et al. (2006) showed that AP-1 transcriptional activity increased 40% after exposure to GCDCA in HepG2 cells. In addition, the administration of an inhibitor of AP-1 (Bernt et al., 2006) or taurine conjugate of ursodeoxycholate (Pusl et al., 2008) reduced GCDCA-induced apoptosis in HepG2 cells. GCDCA did not increase AP activation in HepG2, but NAC reduced AP-1 expression in nuclear fraction from control and GCDCA-treated HepG2 cells.

In conclusion, our study suggests that the administration NAC rose the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, NOS-3 expression and reduced cell death induced by GCDCA in HepG2 cells. Further studies are required to elucidate the relative impact of AP-1 and antioxidant response elements regulation in the cytoprotective properties of NAC against GCDCA-induced cell death in HepG2.

### Acknowledgments

This study has been supported by the Instituto de Salud Carlos III (FIS 02/0181 and FIS 05/0703) and the Consejería de Salud (SAS 50/03). CIBERehd and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición are funded by the Instituto de Salud Carlos III. We thank Dr. Emilio Fernández from the Biochemistry and Molecular Biology Department (University of Córdoba) for its technical assistance in the measurement of AP-1 expression.

### References

- Alexander, B., 1998. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition* 14, 376–390.
- Attali, A.F., Angelico, M., Cantafora, A., Alvaro, D., Capocaccia, L., 1986. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic–hydrophilic balance of bile acids. *Med. Hypotheses* 19, 57–69.
- Bernt, C., Vennegheerts, T., Beuers, U., Rust, C., 2006. The human transcription factor AP-1 is a mediator of bile acid-induced liver cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 800–806.
- Beuers, U., Nathanson, M.H., Boyer, J.L., 1993. Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic  $Ca^{2+}$  signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 104, 604–612.
- Beuers, U., Throckmorton, D.C., Anderson, M.S., Isales, C.M., Thasler, W., Kullak-Ublick, G.A., Sauter, G., Koebe, H.G., Paumgartner, G., Boyer, J.L., 1996. Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 110, 1553–1563.
- Beuers, U., Probst, I., Soroka, C., Boyer, J.L., Kullak-Ublick, G.A., Paumgartner, G., 1999. Modulation of protein kinase C by taurochenodeoxycholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 29, 477–482.
- Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G.A., Keppler, D., Paumgartner, G., Dombrowski, F., 2001. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 33, 1206–1216.
- Botla, R., Spivey, J.R., Aguilar, H., Bronk, S.F., Gores, G.J., 1995. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 930–938.
- Bucher, B.T., Feng, X., Jeyabalan, G., Zhang, B., Shao, L., Guo, Z., Geller, D.A., 2007. Glycochenodeoxycholate (GCDC) inhibits cytokine induced iNOS expression in rat hepatocytes. *J. Surg. Res.* 138, 15–21.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S., 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 323–333.
- Chung, H.T., Pae, H.O., Choi, B.M., Billiar, T.R., Kim, Y.M., 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1075–1079.
- Clemens, M.G., 1999. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 30, 1–5.
- Colell, A., García-Ruiz, C., Miranda, M., Ardite, E., Mari, M., Morales, A., Corrales, F., Kaplowitz, N., Fernández-Checa, J.C., 1998. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 115, 1541–1551.
- Dionisio, N., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Majano, P.L., Benedicto, I., Rosado, J.A., Salido, G.M., González-Gallego, J., 2009. Hepatitis C virus NSA and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signaling alterations in hepatocytes. *J. Hepatol.* 50, 872–882.

- Ermak, G., Davies, K.J.A., 2002. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.* 38, 713–721.
- Esposito, F., Ammendola, R., Faraonio, R., Russo, T., Cimino, F., 2004. Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochem. Res.* 29, 617–628.
- Forman, H.J., Fridovich, I., 1973. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 396–400.
- Galle, P.R., Theilmann, L., Raedtsch, R., Otto, G., Stiehl, A., 1990. Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 12, 486–491.
- González, R., Ferrín, G., Hidalgo, A.B., Ranchal, I., López-Cillero, P., Santos-González, M., López-Lluch, G., Briceño, J., Gómez, M.A., Poyato, A., Villalba, J.M., Navas, P., De la Mata, M., Muntané, J., 2009. N-Acetylcysteine, Coenzyme Q10 and Superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by D-galactosamine in primary culture of human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 181, 95–106.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138.
- Greim, H., Trulzsch, D., Czygan, P., Rudick, J., Hutterer, F., Schaffner, F., Popper, H., 1972. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* 63, 846–850.
- Huie, R.E., Padmaja, S., 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 195–199.
- Hu, Q., Corda, S., Zweier, J.L., Capogrossi, M.C., Ziegelstein, R.C., 1998. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation* 97, 268–275.
- Jones, B.A., Rao, Y.P., Stravitz, R.T., Gores, G.J., 1997. Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 272, G1109–G1115.
- Kelly, G.S., 1998. Clinical applications of N-Acetylcysteine. *Altern. Med. Rev.* 3, 114–127.
- Kim, Y.M., Talanian, R.V., Billiar, T.R., 1997. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272, 31138–31148.
- Kim, Y.M., Chung, H.T., Simmons, R.L., Billiar, T.R., 2000. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* 275, 10954–10961.
- Li, C.Q., Wogan, G.N., 2005. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* 226, 1–15.
- Matsumaru, K., Ji, C., Kaplowitz, N., 2003. Mechanisms for sensitization to TNF-induced apoptosis by acute glutathione depletion in murine hepatocytes. *Hepatology* 37, 1425–1434.
- Mitsuyama, T., Hidaka, K., Furuno, T., Hara, N., 1998. Release of nitric oxide and expression of constitutive nitric oxide synthase of human endothelial cells: enhancement by a 14-membered ring macrolide. *Mol. Cell. Biochem.* 181, 157–161.
- Nagai, H., Matsumaru, K., Feng, G., Kaplowitz, N., 2002. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 36, 55–64.
- Nicotera, P., Orrenius, S., 1998. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23, 173–180.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovskiy, B., 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 143–183.
- Park, Y.C., Jun, C.D., Kang, H.S., Kim, H.D., Kim, H.M., Chung, H.T., 1996. Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology* 87, 296–302.
- Patel, T., Bronk, S.F., Gores, G.J., 1994. Increases of intracellular magnesium promote glycodeloxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 94, 2183–2192.
- Pusch, T., Vennegeerts, T., Wimmer, R., Denk, G.U., Beuers, U., Rust, C., 2008. Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 208–212.
- Ramasamy, S., Drummond, G.R., Ahn, J., Storek, M., Pohl, J., Parthasarathy, S., Harrison, D.G., 1999. Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 56, 116–123.
- Rodrigues, C.M., Fan, G., Ma, X., Kren, B.T., Steer, C.J., 1998. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J. Clin. Invest.* 101, 2790–2799.
- Rosado, J.A., Redondo, P.C., Salido, G.M., Pariente, J.A., 2006. Calcium signalling and reactive oxygen species in non-excitatory cells. *Mini-Reviews Med. Chem.* 6, 409–415.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., Schaffner, W., 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with “mini-extracts”, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 6419.
- Sen, C.K., Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10, 709–720.
- Shiba, D., Shimamoto, N., 1999. Attenuation of endogenous oxidative stress-induced cell death by cytochrome P450 inhibitors in primary cultures of rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1019–1026.
- Siendones, E., Fouad, D., Diaz-Guerra, M.J., De la Mata, M., Bosca, L., Muntane, J., 2004. PGE1-induced NO reduces apoptosis by D-galactosamine through attenuation of NF- $\kappa$ B and NOS-2 expression in rat hepatocytes. *Hepatology* 40, 1295–1303.
- Sinbandhit-Tricot, S., Cillard, J., Chevanne, M., Morel, I., Cillard, P., Sergent, O., 2003. Glutathione depletion increases nitric oxide-induced oxidative stress in primary rat hepatocyte cultures: involvement of low-molecular-weight iron. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1283–1294.
- Singh, R., Czaja, M.J., 2007. Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, S45–S48.
- Sokol, R.J., Winkhofer-Roob, B.M., Devereaux, M.W., McKim Jr, J.M., 1995. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109, 1249–1256.
- Spivey, J.R., Bronk, S.F., Gores, G.J., 1993. Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J. Clin. Invest.* 92, 17–24.
- Tran, Q.K., Ohashi, K., Watanabe, H., 2000. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 48, 13–22.
- Uedono, Y., Takeyama, N., Yamagami, K., Tanaka, T., 1997. Lipopolysaccharide-mediated hepatic glutathione depletion and progressive mitochondrial damage in mice: Protective effect of glutathione monoethyl ester. *J. Surg. Res.* 70, 49–54.
- Vieira, H., Kroemer, G., 2003. Mitochondria as targets of apoptosis regulation by nitric oxide. *IUBMB Life* 55, 613–616.
- Xiao, Z., Zhang, Z., Ranjan, V., Diamond, S.L., 1997. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J. Cell. Physiol.* 171, 205–211.
- Yerushalmi, B., Dahl, R., Devereaux, M.W., Gumprich, E., Sokol, R.J., 2001. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 33, 616–626.
- Zaragoza, A., Ez-Fernandez, C., Alvarez, A.M., Andres, D., Cascales, M., 2001. Mitochondrial involvement in cocaine-treated rat hepatocytes: effect of N-acetylcysteine and deferoxamine. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1063–1070.
- Zhang, R., Min, W., Sessa, W.C., 1995. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 15320–15326.



Contents lists available at ScienceDirect

## Biochemical Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochempharm](http://www.elsevier.com/locate/biochempharm)



# GCDCA down-regulates gene expression by increasing Sp1 binding to the NOS-3 promoter in an oxidative stress dependent manner

Sandra González-Rubio<sup>a</sup>, Laura López-Sánchez<sup>a,b</sup>, Juan Muñoz-Castañeda<sup>a</sup>, Clara I. Linares<sup>a</sup>, Patricia Aguilar-Melero<sup>a</sup>, Manuel Rodríguez-Perálvarez<sup>a,c</sup>, Rafael Sánchez-Sánchez<sup>d</sup>, Ana Fernández-Álvarez<sup>e</sup>, Marta Casado<sup>c,e</sup>, Jose L. Montero-Álvarez<sup>a,c</sup>, Antonio Rodríguez-Ariza<sup>a,b</sup>, Jordi Muntané<sup>a,c,2</sup>, Manuel de la Mata<sup>a,c,1,\*</sup>, Gustavo Ferrín<sup>a,c,1,\*</sup>

<sup>a</sup> Maimonides Institute of Biomedical Research (IMIBIC), Reina Sofía Hospital, University of Córdoba, Córdoba 14004, Spain

<sup>b</sup> Spanish Cancer Network (RTICC), Instituto de Salud Carlos III, Córdoba 14004, Spain

<sup>c</sup> Biomedical Research Centre Network, Digestive and Liver Diseases (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Córdoba 14004, Spain

<sup>d</sup> Anatomical Pathology Service, Reina Sofía University Hospital, Córdoba 14004, Spain

<sup>e</sup> Biomedicine Institute of Valencia (IBV-CSIC), Valencia 46010, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 March 2015

Accepted 23 April 2015

Available online xxx

#### Keywords:

Cholestatic liver disease  
Endothelial nitric oxide synthase  
Oxidative stress  
Transcription factor Sp1  
Glycochenodeoxycholic acid

### ABSTRACT

During the course of cholestatic liver diseases, the toxic effect of bile acids accumulation has been related to the decreased expression of endothelial nitric oxide synthase (NOS-3) and cellular oxidative stress increase. In the present study, we have investigated the relationship between these two biological events. In the human hepatocarcinoma cell line HepG2, cytotoxic response to GCDCA was characterized by the reduced activity of the respiratory complexes II + III, the increased expression and activation of the transcription factor Sp1, and a higher binding capacity of this at positions –1386, –632 and –104 of the NOS-3 promoter (pNOS-3). This was associated with a decreased promoter activity and a consequent reduction of NOS-3 expression. The use of antioxidants in GCDCA-treated cells caused a lower activation of Sp1 and the recovery of the pNOS-3 activity and NOS-3 expression and activity. Similarly, the specific inhibition of Sp1 resulted in the improvement of NOS-3 expression. Both, antioxidant treatment and Sp1 inhibition were associated with the reduction of cell death-related parameters. Bile duct ligation in rats confirmed *in vitro* results concerning the activation of Sp1 and the reduction of NOS-3 expression. Our results provide direct evidence for the involvement of Sp1 in the regulation of NOS-3 expression during cholestasis. Thus, the identification of Sp1 as a potential negative regulator of NOS-3 expression represents a new mechanism by which the accumulation of bile acids causes a cytotoxic effect through the oxidative stress increase, and provides a new potential target in cholestatic liver diseases.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Abbreviations:** ADHP, 0-acetyl-3, 7-dihydroxyphenoxazine; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BDL, bile duct ligation group; CLD, cholestatic liver disease; DHE, dihydroethidium; ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GCDCA, Glycochenodeoxycholic acid; GGT<sub>v</sub>, -glutamyltranspeptidase; GPX, glutathione peroxidase; HDAC, histone deacetylase; H<sub>2</sub>DCFDA, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; JNK, cJun-terminal kinase; LDH, lactate dehydrogenase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Mita, mithramycin A; MitoQ, mitochondria-targeted ubiquinone; MnTBAP, manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NOS-3, endothelial NOS; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide anion radical; OXPHOS, oxidative phosphorylation; pNOS-3, NOS-3 promoter; ROS, reactive oxygen species; SO, Sham operated control group; SOD, superoxide dismutase; TA, tolfenamic acid; TFBS, transcription factors binding sites.

\* Corresponding author at: Maimonides Institute of Biomedical Research (IMIBIC), Reina Sofía Hospital, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain. Tel.: +34 957213808; fax: +34 957010452.

E-mail address: [gusfesa@gmail.com](mailto:gusfesa@gmail.com) (G. Ferrín).

<sup>1</sup> These two authors have contributed equally to the study.

<sup>2</sup> Present address: Department of General Surgery, Hospital Universitario Virgen del Rocío-Virgen Macarena/IBIS/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.017>

0006-2952/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article in press as: González-Rubio S, et al. GCDCA down-regulates gene expression by increasing Sp1 binding to the NOS-3 promoter in an oxidative stress dependent manner. *Biochem Pharmacol* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.017>



## 1. Introduction

Bile salt synthesis, secretion and recycling represent crucial liver functions for the maintenance of metabolic homeostasis. During cholestatic liver disease (CLD), toxic bile acids are accumulated in serum and liver as a consequence of their impaired formation and excretion into the hepatocyte canalculus, which can result in fibrosis, cirrhosis and chronic liver failure [1]. It has been proposed that the deleterious effect of the accumulation of bile acids during cholestasis is related to oxidative stress. Thus, liver injury occurring from the bile duct ligation has been associated with mitochondrial dysfunction, which is an important source of reactive oxygen species (ROS), and disturbances in the antioxidant system [2,3].

Nitric oxide (NO) is a well-known pleiotropic agent influencing multiple aspects of the liver physiopathology. Depending on factors such as its concentration or generating source, NO has been reported to act as a primary mediator of liver damage or as a potent protective against hepatic injury [4]. In liver, NO can be synthesized by the activity of the three known isoforms of nitric oxide synthase (NOS), the endothelial isoform (NOS-3) being considered as the main source of endogenous NO [5]. The use of molecular treatments associated with the increase of NOS-3 expression and activity in CLD has shown a beneficial effect for the liver [6,7]. In addition, the administration of antioxidants reduces the hepatotoxicity of bile acids *in vitro* [8–10] and *in vivo* [3], through the prevention of NOS-3 expression decrease and the detoxification of ROS [11]. Thus, bioreactivity of NO mitigates the effect of ROS production [12]. Besides its role in ROS detoxification,

NO can act as a cytoprotective agent by inhibiting caspases through direct nitrosylation [13].

Glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) is a bile salt generated in the liver from chenodeoxycholic acid and glycine, whose relatively high toxicity and concentration in bile and serum after cholestasis has extended its use in cellular models of the disease [8–10]. Previously, we have reported that NOS-3 expression is decreased in the human hepatocarcinoma cell line HepG2 in response to GCDCA, and that the recovery of its expression and activity is related to the cytoprotective action of antioxidant molecules [8,9]. In the present study we set out to identify the elements responsible for regulating NOS-3 expression during CLD, as well as to analyse the role of oxidative stress in this process. Clarifying molecular mechanisms underlying hepatocellular cytotoxicity related to cholestasis disorders could be helpful for the design and development of new interventional strategies and treatments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell lines and culture conditions

The human hepatocarcinoma cell line HepG2 (European Collection of Cell Cultures) was routinely maintained as previously reported [8,9]. The pGL4-NOS3 cell line was obtained by stable transfection of HepG2 cells with the plasmid pGL4.20 [luc2/Puro] (Promega, Wisconsin, USA) containing the luciferase reporter gene under the control of the human NOS-3 promoter (pNOS-3; 1601 nucleotides, GenBank accession no. AF387340.1; Fig. 1). Dr. Huige Li (Department of Pharmacology, Johannes Gutenberg

```

ctgatgctgc ctgtcacctt gaccctgagc atgccagtca cagctccatt aactgggacc -1542
taggaaaaatg agtcatcctt ggcatgcac atttcaaatg gtggcttaat atggaagcca -1482
gacttgggat ctgttgtctc ctccagcatg gtagaagatg cctgaaaagt aggggctgga -1422
tcccatcccc tgcctcactg ggaagcgcag gtggGGGGT GGGGTggggc ctcaggcttg -1362
gggtcatggg acaaagccca ggctgaatgc cgccctcca tctccctcct cctgagacag -1302
gggcagcagc gcacactagt gtccaggagc agcttatgag gcccttcac cctccatcct -1242
ccaaaactgg cagacccac cttcttggtg tgacccaga gctctgagca cagcccgttc -1182
cttcgcctg cggcccccc acccaggccc accccaacct tctcctccac tgcctttcag -1122
aggagtctgg ccaacacaaa tctcttgggt tgtttgtctg tctgtctgct gctcctagtc -1062
tctgctctc ccagctctc agcttccgtt tctttcttaa actttctctc agtctctgag -1002
gtctgaaat cagcaggctt cgaccctgt ggaccagatg ccagctagt ggcctttctc -942
cagcccctca gatggcacag aactacaaa cccagcatgc actctggcct gaagtgcctg -882
gagagtctg gtgtaccca cctgcattct gggaactgta gtttccctag tccccatgc -822
tcccaccagg gcatcaagct cttccctggc cggetgacc tgcctcagcc ctagtctctc -762
tgcctgacct cggccccggg aagcgtgcgt cactgaatga cagggtgggg gtggaggcac -702
tgggaaggcag cttcctgctc ttttgtgtcc ccaacttgag tcatgggggt gtgggggttc -642
caggaaatG GGGCTGGGA gggaaggat accctaatgt cagactcaag gacaaaaagt -582
cactacatcc ttgctgggcc tctatcccca agaaccocaa aggactcaag ggtggggatc -522
caggagtctc tgtatgtatg gggggagggt aaggagagaa cctgcatgac cctagagggtc -462
cctgtggtea ctgagagtgt gggctgccat ccctgctac agaaacgggt ctcacctctc -402
gcccacccct ccagggaaaag gcacacaggg gtgaggccga aggcccttc gtctgggtgcc -342
acatcacaga aggaccttta tgacccccct gtggctctac cctgccactc cccaatgccc -282
cagcccccat gctgcagccc cagggtctct ctggacacct gggtccccc ttatcagcct -222
cagctctcac agcggaaacc aggcgtccgg cccccacc ttcaggccag cgggctgga -162
gctgaggctt tagagcctcc cagccgggct tgttctctgc ccattgtgta tgggataGGG -102
CGGGGcag ggccagcact ggagagcccc ctcccactgc ccctcctct cggccccctc -42
cctcttccca aggaaaagc cagggtctct ctggagcagg Cagcagagtg gacgcacagt 19
aadATGgca acttgaagag cgtggcccag gagcctgggc caccctgcgg cctggggctg 79

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the human NOS-3 promoter. Sequence of 1601 bases of the 5'-flanking region of the human NOS-3 gene (GenBank accession number AF387340.1). Circles: start codon ATG, and position -1 of the pNOS-3; Boxes: Sp1 Binding Sites; Arrows: Forward/Reverse primers used in ChIP assays.

University, Mainz, Germany) kindly donated the pNOS-3 sequence and no sequence variations were detected after vector construction. The control cell line pGL4 was obtained by stable transfection of HepG2 cells with the pGL4.20 [luc2/Puro] vector, without promoter sequence insertion. For the establishment of the cell lines, 75,000 cells/cm<sup>2</sup> were transfected with the appropriate vector, using the Fugene6 transfection reagent (Roche, Basel, Switzerland) in 1:3.5 ratio (μg plasmid DNA:μl Fugene6). Transfected cells were selected by adding 2 μg/ml puromycin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) to the culture medium. Thirteen cell clones for pGL4-NOS3 were isolated after antibiotic selection.

## 2.2. In vitro studies

### 2.2.1. Experimental procedure

Cells were plated at 150,000 cells/cm<sup>2</sup> and 0.5 mM GCDCA (Sigma-Aldrich) was administered after 48 h of cell culture. The SOD mimetic MnTBAP (manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride) (Calbiochem, Darmstadt, Germany) and the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ were administered at concentration of 0.1 mg/ml and 1 μM, respectively. Specific Specificity protein (Sp) transcription factor (TF) inhibitors tolfenamic acid (TA) and mithramycin A (MitA) were used at 60 μM and 20 nM, respectively (Sigma-Aldrich). Cells were harvested at different times according to the parameter under study. MitoQ was synthesized according to the procedure described by Kelso et al. [14].

## 2.3. In vivo studies

### 2.3.1. Experimental animal model of cholestasis

Male Wistar rats (200–250 g) were kept in controlled conditions of light and temperature, and were provided with food and water *ad libitum* before and after surgery. Animals were treated according to institutional guidelines, and approval to conduct this study was granted by the Reina Sofia University Hospital Research Ethics Committee. Animals were randomized into two groups: Sham operated control group (SO group, *n* = 13) and bile duct ligation group (BDL group, *n* = 13). Surgical procedure and sample collection were carried out as we described before [15]. Briefly, 13 animals in each group were killed 7 days after surgery under sevofluorane anaesthesia. Blood was collected from the abdominal aorta and the serum obtained was frozen at –20 °C until the measurement of biochemical parameters. After perfusion with cold saline solution, the liver was rapidly removed for histological examination. Some liver specimens were frozen in liquid nitrogen and immediately stored at –80 °C for the subsequent analysis. Fig. 2 shows a representative scheme about the experimental procedure. It should be noted that in the BDL group there was

death from the fifth day after surgery. On the seventh day of cholestasis (last day) the death rate was 35%. Only animals that survived biliary obstruction were considered in the BDL group.

## 2.4. Preparation of cell extracts and tissue lysates

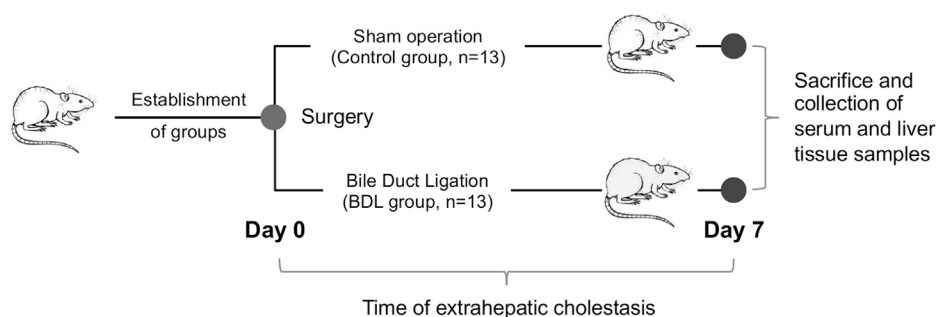
Protein extracts from HepG2 were obtained by incubating the cells in a lysis buffer containing 50 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 5 μg/ml aprotinin and 10 μg/ml leupeptin (Sigma-Aldrich). Rat liver lysates were obtained by mechanical disruption of liver tissue, using the Sample Grinding Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and the same buffer described above. The integrity and concentration of protein samples were determined by the Ponceau staining and the Bradford method, respectively.

## 2.5. Evaluation of parameters of oxidative stress

General ROS production and redox status was quantified by using the fluorescent probes dihydroethidium (DHE), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) and 10-acetyl-3, 7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) (Life Technologies, California, USA). DHE detects cytosolic superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and hydroxyl radical, and reacts with peroxynitrite-derived oxidants. H<sub>2</sub>DCFDA detects hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) but also hydroxyl radical, carbonate radical, nitrogen dioxide and thiyl radicals resulting from thiol oxidation. ADHP oxidation is observed in the presence of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [16]. Cells were incubated with 10 μM DHE or H<sub>2</sub>DCFDA for 20 min and 30 min, respectively. After that, cells were washed with PBS and oxidative stress production was assessed *in situ* as the fluorescence emitted by DHE (λ<sub>ex</sub> = 510 nm/λ<sub>em</sub> = 590 nm) and H<sub>2</sub>DCFDA (λ<sub>ex</sub> = 500 nm/λ<sub>em</sub> = 520 nm). Negative controls were carried out incubating cells with the corresponding treatment and without probe. The ADHP-based ROS detection kit was used following the manufacturer instruction. Briefly, HepG2 cells were collected and sonicated in PBS using a Bioruptor System UCD-200 (Diagenode, Liege, Belgium). After removing cell debris by centrifugation, the supernatants were aliquoted and stored at –80 °C until used. In the measurement, 50 μl from each sample were mixed 1:1 with the reaction mixture containing the 100 μM ADHP and 0.2 U/ml horseradish peroxidase, and the fluorescence increase over time was recorded using excitation at 550 nm and fluorescence detection at 595 nm.

## 2.6. Enzymatic activity measurement of the respiratory complexes

Mitochondria were isolated from cultured cells as previously described [17] and were used to measure the different enzymatic activities. Activities of citrate synthase (CS) and respiratory



**Fig. 2.** Experimental design of the *in vivo* study. Before surgery, the animals were divided into two groups: sham operation group (control group, *n* = 13) and bile duct ligation group (BDL group, *n* = 13). A total of 7 days after the surgical procedure, animals from both groups were sacrificed by exsanguination and serum and liver tissue samples were properly collected and stored at –80 °C until used.

complexes I, II, I + II, II + III and IV were measured by spectrophotometry as described in Lapuente-Brun et al. [18].

### 2.7. Cell death analysis

The apoptosis induction was assessed by the measure of caspase-3 activity in cell extracts and in rat liver lysates (100 µg of protein) as previously described [8,9]. Hepatocellular necrosis was evaluated through the cellular release of lactate dehydrogenase (LDH) as we previously described in [8]. The LDH release was calculated as the ratio of  $[(\text{LDH culture medium})/(\text{LDH cytoplasm} + \text{LDH culture medium})] \times 100$ .

### 2.8. Evaluation of liver injury in bile duct ligated rats

Serum concentrations of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and total and direct bilirubin were determined by commercial assays as liver injury markers (Linear Chemicals SL, Barcelona, Spain).

### 2.9. NOS-3 promoter activity (luciferase reporter assay)

pGL4-NOS3 and pGL4 cells (15,000/well) were plated in 384-well black microplates. Luciferase activity was measured using the One-Glow Luciferase Assay System (Promega). Briefly, cells were lysed with 20 µl of 1× Lysis Buffer, and 40 µl of cell extract were used for luciferase assay according to the manufacturer's recommendations.

### 2.10. Gene expression analysis

Gene expression at the mRNA level was determined by quantitative real-time PCR using a One-Step QuantiTect SYBR-Green Kit (Qiagen, Limburg, Netherlands). Total cellular RNA was extracted, treated with RNase-Free DNase and used as template for mRNA amplification with specific primers. Human primers (forward, F, and reverse, R) were located in the coding DNA sequence at positions described below: NOS-3 (NM\_000603.4), F: 3697–3719, R: 3895–3873; glutathione peroxidase 4 (GPX4; NM\_002085.3), F: 403–422, R: 609–687; catalase (NM\_001752.3), F: 1028–1053, R: 1179–1159; superoxide dismutase 1 (SOD1; NM\_000454.4), F: 430–451, R: 539–519; SOD2 (NM\_001024465.1), F: 708–728, R: 867–845; ribosomal protein L13A (RPL13A; NM\_012423.3), F: 541–563, R: 666–642. Rat primers were located at positions: Nos-3 (XM\_006235872.1), F: 3274–3293, R: 3375–3355; Gpx1 (NM\_030826.3), F: 312–332, R: 450–433; Gpx4 (NM\_001039849.2), F: 542–561, R: 707–688; catalase (NM\_012520.2), F: 1631–1654, R: 1706–1686; Sod1 (NM\_017050.1), F: 219–237, R: 319–299; Sod2 (NM\_017051.2), F: 226–245, R: 416–397; hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hrpt1; NM\_012583.2), F: 179–203, R: 301–277.

### 2.11. Protein expression analysis by Western blot

Between 80 and 100 µg of protein from cell extracts or rat liver lysates were separated in a 10–12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and sequentially blotted against monoclonal or polyclonal primary antibodies. Primary antibodies were anti-NOS-3 (sc-654, dilution 1:200), anti-Sp1 (ref. sc-420/X, dilution 1:2000), anti-p-Sp1 (ref. ab37707, diluted 1:1000), anti-p-JNK (ref. sc-6254, diluted 1:300), anti-p-ERK1/2 (ref. 4370, diluted 1:2000) and  $\beta$ -Actin (ref. sc-47778, diluted 1: 10,000). All antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (California, USA), except anti-p-Sp1 (Abcam, Cambridge, UK) and anti-p-ERK1/2 (Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA). The densitometry analysis was performed by Quantity One software (v.4.4.0)

(Bio-Rad, California, USA).  $\beta$ -Actin was used as a loading control in the analysis of protein expression that was performed in the HepG2 cell line. In the rat liver lysates, the results of the Sp1 expression analysis were represented as the phosphorylated/non-phosphorylated protein ratio. Similarly, NOS-3 protein expression in rat liver lysates was referred to the protein load (Ponceau staining). In this case, to avoid errors in the quantification of the NOS-3 expression as a result of using different gels for the analysis of numerous samples, we used one of the control samples as an internal standard in each of the gels. Thus, all samples in both groups control and BDL were referred to this unique sample.

### 2.12. Nitric oxide production

NO production was determined by the Griess reaction as we previously described [9]. In order to allow the accumulation of NO-related end products nitrates and nitrites, the cell culture medium was collected 24 h after the administration of the treatment. This ensured the sensitivity and reproducibility of the reaction. Nitrite concentrations were accurately determined by a nitrite calibration curve.

### 2.13. Identification of transcription factors binding sites in the pNOS-3

The identification of theoretical transcription factors binding sites (TFBS) in the pNOS-3 sequence was performed using the three different free online software tools for TFBS prediction: Transcription Factor Search (TFsearch v.1.3; <http://www.cbrc.jp.reserach/db/TFSEARCH.html>), Transcription Element Search System (TESS; <http://www.cbil.upenn.edu/tess>) and Transcription Factor Site Scan (TF site scan; <http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl>).

### 2.14. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-RT-qPCR assay

ChIP-assays were performed as we previously described [19], using isolated nuclei from the formaldehyde-cross-linked HepG2 cells. Immunoprecipitation was performed using primary antibody anti-Sp1 and magnetic beads (Dynabeads<sup>®</sup> Protein G, Life Technologies). RNA polymerase II (PolII) and normal rabbit IgG were used as positive and negative control, respectively, using antibodies anti-PolII (ref. sc-899) and anti-IgG (ref. sc-2027). 4 µg of antibody was used for each experiment. All primary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. Purified samples were analysed by RT-qPCR, using SensiFast SYBR kit (Bioline, London, UK) and primers used to detect target sequences were as follows (Fig. 1): -1386 Sp1 site, 5'-CTGTTGTCTCCTCCAGCATGGT-3' and 5'-GGATCCAGCCCTACTTTTCAG-3'; -632 Sp1 site, 5'-TTGTGTCCTCCACTTGAGTCA-3' and 5'-CCCCAATTCCTGGAACCC-3'; -104 Sp1 site, 5'-GCGTGAGCTGAGGCTTTA-3' and 5'-CGCCCCTATCCCATACACA-3'; NOS-3 coding region (NM\_000603.4), 5'-CCGGGACTTCATCAACCAGTA-3' (positions 677–697 in exon 4) and 5'-TCCGGGAAGCTGTCACTC-3' (position exon 4/intron 4–5); glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) coding region (NM\_002046.4), 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3' (position 155–174 in exon 2) and 5'-ACCCGTTGACTCCGACCTT-3' (position exon 2/intron 2–3). For quantification purposes, a calibration curve was elaborated for each amplicon by 10-fold serial dilutions of the total input sample. Results were expressed as percent of input considering the input as 100% and the negative control as 0%.

### 2.15. Immunohistochemical analysis

The expression of CD68 was analysed by immunohistochemistry in 4% paraformaldehyde-fixed paraffin-embedded liver tissue sections (4 µm) mounted on glass slides coated with poly-L-lysine. The sections were dewaxed in xylene, rehydrated in ethanol and

incubated at 100 °C in ChemMate Target Retrieval Solution, pH 6.0 (Dako, Barcelona, Spain) for 20 min. After washing in PBS, the sections were immunostained using an autostainer (Cytomation, Dako). Slides were incubated for 10 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to block endogenous peroxidase and then incubated for 1 h with anti-CD68 antibody (Santa Cruz Biotechnology; ref. sc-59103; 1:50 dilution). After washing 5 min in PBS, the slides were incubated for 30 min with an HRP-labelled polymer (Envision System, Dako) and developed for 15 min using diaminobenzidine. Finally, the slides were counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt mounting medium (Sigma-Aldrich).

### 2.16. Statistical analysis

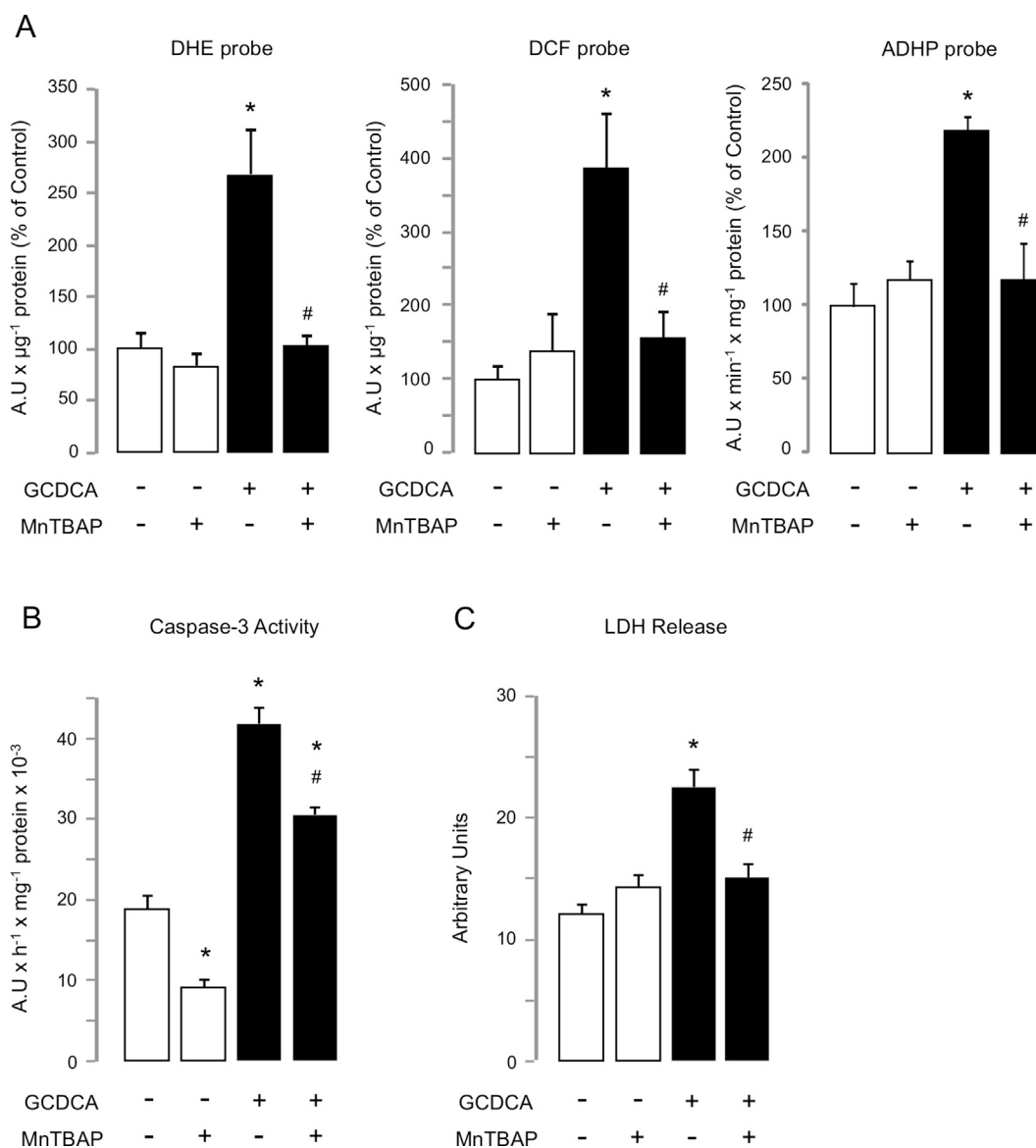
Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of a minimum of 3 independent experiments. Data were compared using the non-parametric method Kruskal-Wallis, and the Dunnett's T3 test as post hoc multiple comparison analysis. Data from ChIP analysis and respiratory activity experiments, involving control and GCDCA-treated samples, as well as those from the *in vivo* study were

analysed with the Mann-Whitney *U* test. Statistical differences were set at  $p < 0.05$  in all studies. All tests and calculations were done with the statistical package StatView 5.0 (SAS Institute, Inc.) and SPSS 15.0 (IBM) for Windows.

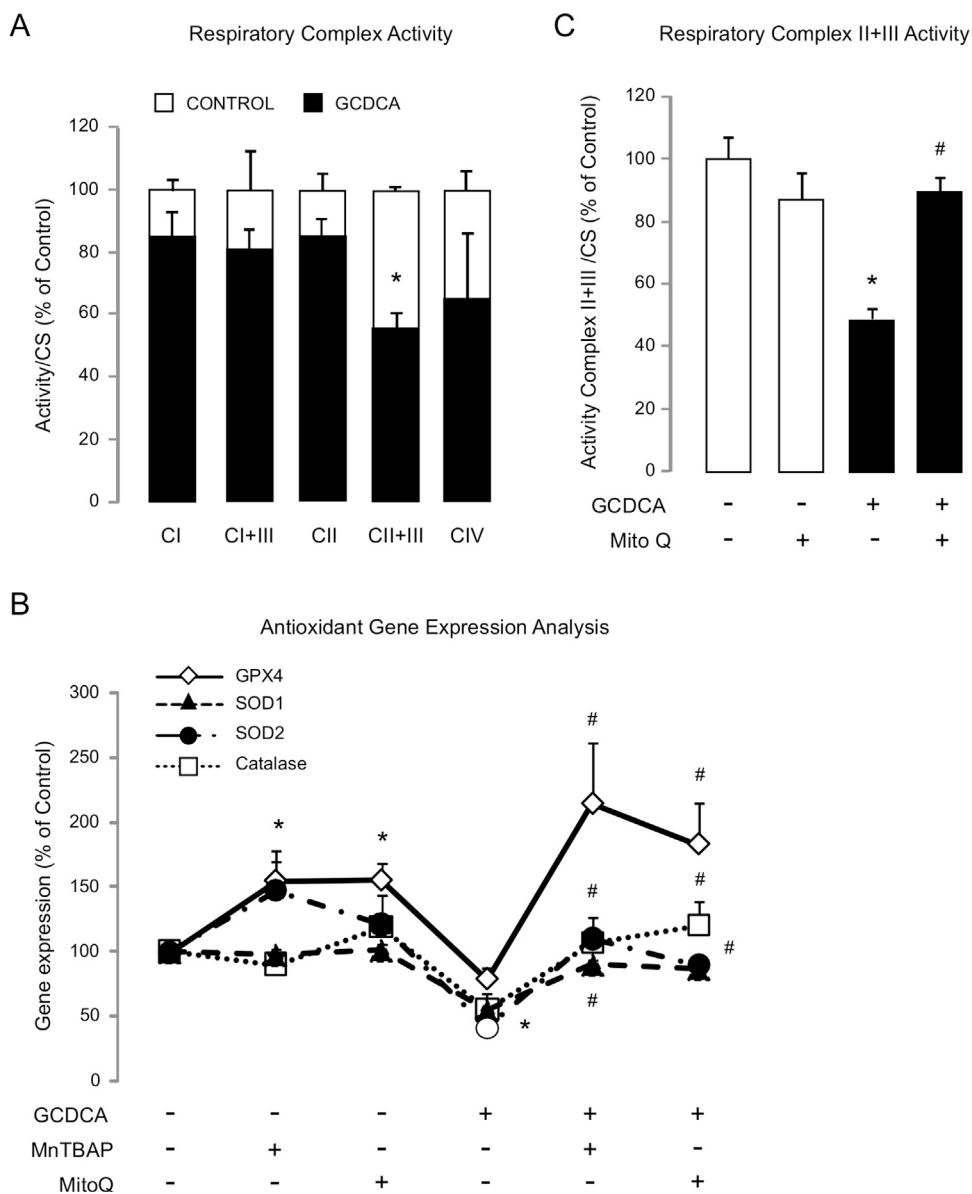
## 3. Results

### 3.1. GCDCA induces cell death associated with oxidative stress increase and antioxidant system dysfunction

In HepG2 cells, the administration of GCDCA induced oxidative stress (268% for DHE,  $p = 0.045$ ; 386% for H<sub>2</sub>DCFDA,  $p = 0.002$ ; 219% for ADHP,  $p = 0.049$ ) (Fig. 3A) and cell death (222% for caspase-3 activity,  $p = 0.002$ ; 186% for LDH release,  $p = 0.006$ ) (Fig. 3B and C). This coincided with a decrease in the activity of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system (Fig. 4A) and with disturbances in the cellular antioxidant system (Fig. 4B). Thus, GCDCA caused the inhibition of the respiratory complex II + III activity (56%,  $p < 0.001$ ) and the expression deregulation of the antioxidant genes SOD1 (55%,  $p = 0.002$ ), SOD2 (42%,  $p < 0.001$ ) and catalase



**Fig. 3.** GCDCA induces oxidative stress and cell death in HepG2 cells. (A) Overall ROS production was quantified by using the fluorescent probes DHE, H<sub>2</sub>DCFDA and ADHP ( $n = 3$ ). Cell death was assessed by the measure of (B) caspase-3 activity ( $n = 5$ ) and (C) LDH release ( $n = 4$ ). The parameters were determined at 6 h (A) or 24 h (B and C) after GCDCA and/or MnTBAP administration. Data expressed as mean  $\pm$  SE. Statistically significant difference versus control group\* or versus GCDCA group# are marked.



**Fig. 4.** Deregulation of respiratory activity and the antioxidant gene expression in GCDCA-treated cells. (A) Activity of respiratory complexes I, I + III, II, II + III and IV ( $n = 6$ ). Citrate synthase (CS) activity was used as a normalizing. (B) Quantification of gene expression by RT-qPCR ( $n = 6$ ). (C) Activity of respiratory complex II + III ( $n = 6$ ). Cells not exposed/exposed to GCDCA were treated with MnTBAP or MitoQ. The parameters were determined at 6 h after GCDCA and/or MnTBAP or MitoQ administration. Data expressed as mean  $\pm$  SE. Statistically significant difference versus control group\* or versus GCDCA group# are marked.

(55%,  $p < 0.001$ ). The administration of MnTBAP reduced the hepatocellular damage (Fig. 3B and C) by preventing ROS production (Fig. 3A) and by modulating the antioxidant defense machinery (Fig. 4B) in GCDCA-treated HepG2 cells. Thus, MnTBAP recovered the gene expression level of SOD1, SOD2, GPX4 and catalase. Likewise, in the presence of the bile salt, MitoQ restored the activity of the respiratory complex II + III (Fig. 4C) and the basal expression of antioxidant genes (Fig. 4B).

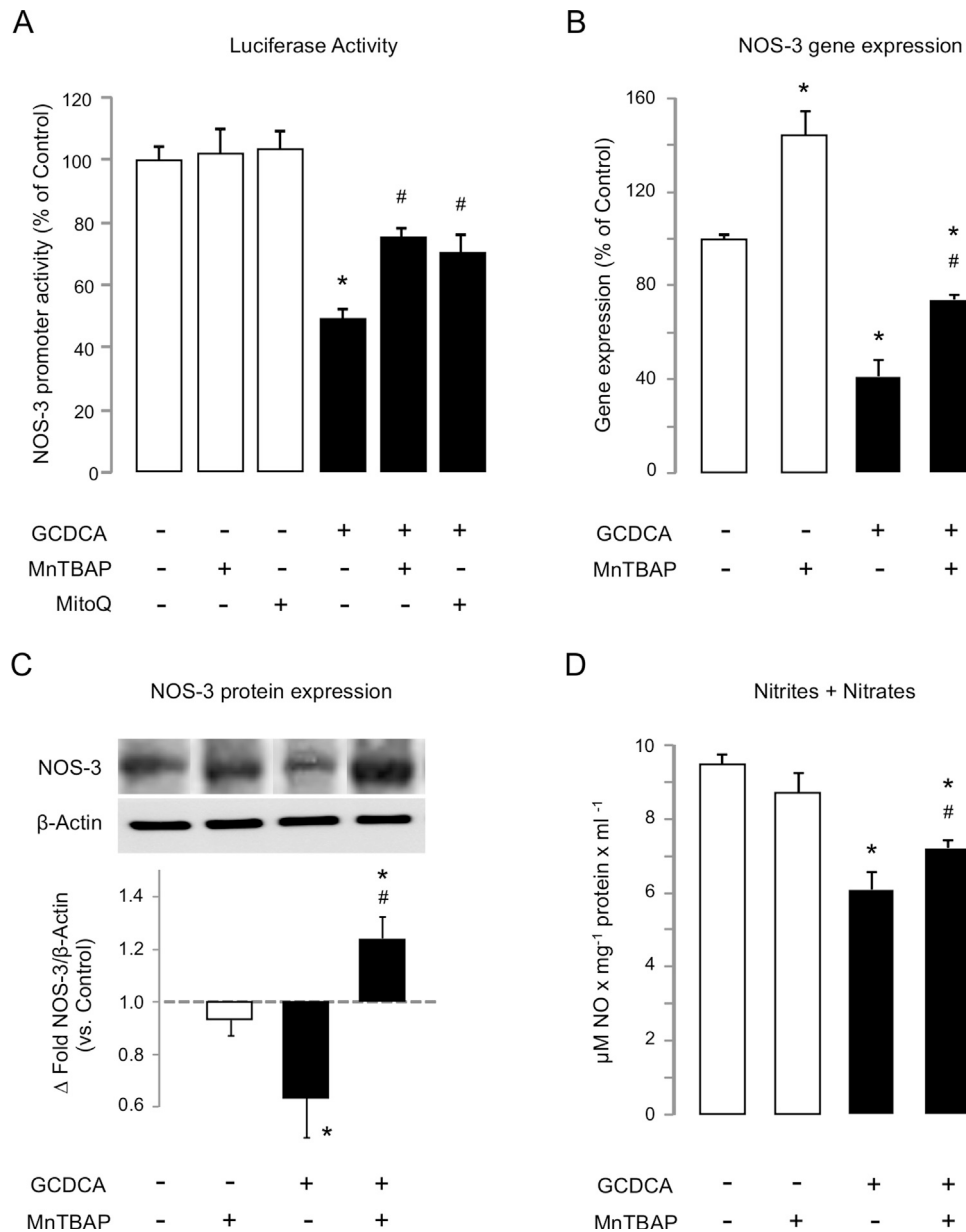
### 3.2. Oxidative stress induced by GCDCA negatively regulates the transcriptional activity of pNOS-3 and NOS-3 expression and activity

As Fig. 5 shows, GCDCA administration decreased: (A) transcriptional activity of pNOS-3 (46%,  $p = 0.021$ ), (B) NOS-3 mRNA levels (41%,  $p = 0.015$ ), (C) NOS-3 protein expression (64%,  $p = 0.046$ ) and (D) the end products of NO oxidation, nitrites and nitrates (64%,  $p = 0.021$ ). MnTBAP treatment reversed the described effects

associated with the administration of the bile acid, and totally/partially recovered the pNOS-3 activity, NOS-3 mRNA and protein levels and nitrite/nitrate production. Similarly, the administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ recovered the pNOS-3 activity (Fig. 5A).

### 3.3. GCDCA-induced oxidative stress stimulates the expression and activation of Sp1

Bioinformatic analysis of the pNOS-3 sequence identified three candidate binding sites for Sp1, which could be involved in the modulation of NOS-3 expression. These Sp1 binding sites were identified unanimously by the three prediction programs used at positions described in Table 1. To elucidate whether Sp1 was involved in the NOS-3 regulation during cytotoxicity by GCDCA, we determined its expression and activation rates in HepG2 cells. GCDCA increased the protein expression level (166%,  $p = 0.008$ )



**Fig. 5.** Effect of GCDCA-induced oxidative stress on NOS-3 expression and activity. (A) NOS-3 promoter activity ( $n = 4$ ). (B) NOS-3 gene expression ( $n = 4$ ). (C) NOS-3 protein expression ( $n = 3$ ). (D) NO-related end products ( $n = 3$ ). The parameters were determined at 6 h (A), 12 h (B) and 24 h (C and D) after GCDCA and/or MnTBAP administration. Data expressed as mean  $\pm$  SE. Statistically significant difference versus control group\* or versus GCDCA group# are marked.

and phosphorylation state (200%,  $p = 0.003$ ) of Sp1. Because the expression and activation of Sp1 can be regulated by the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, we next analysed the activation state of kinases JNK (cJun-terminal kinase) and ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinase). GCDCA administration increased the protein levels of phospho-JNK (235%,  $p < 0.001$ )

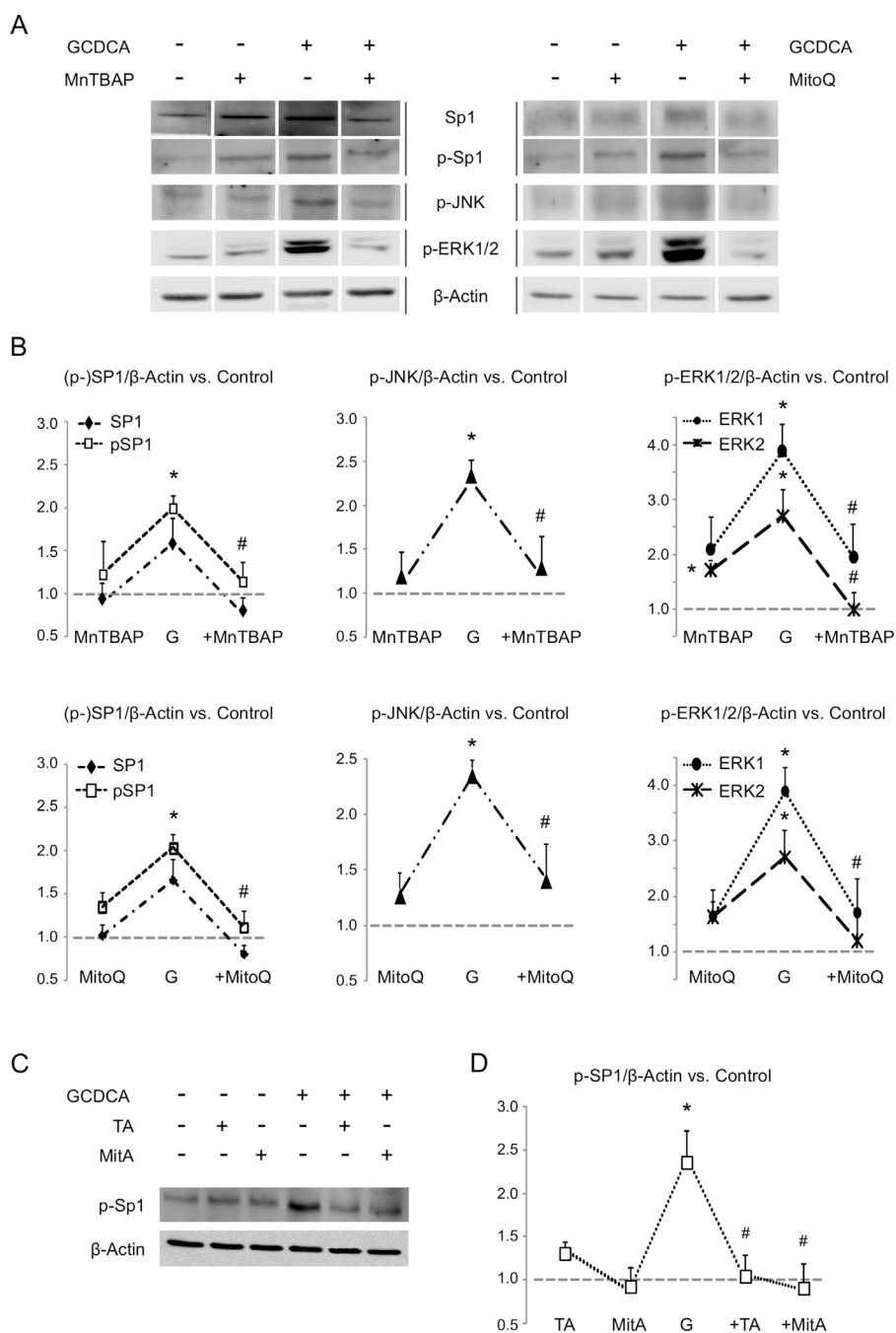
and phospho-ERK1/2 (389%  $p = 0.015/271%$   $p = 0.034$ ) in HepG2 cells. Cellular protection against oxidative injury by treatment with any of the described antioxidants, MnTBAP or MitoQ, reduced the expression and phosphorylation rates of Sp1 and the activation of MAPKs JNK and ERK1/2 during GCDCA-induced cytotoxicity (Fig. 6A and B).

**Table 1**

Proposed Sp1 binding sites in the NOS-3 promoter region (1.6 kb, GenBank accession no. AF387340.1).

TF	TFSEARCH		TESS		TFSITESCAN	
	Position	Sequence	Position	Sequence	Position	Sequence
Sp1	-1386	GGGGTGGGGT	-1384	GGTGGG	-1385	CCCACC
	-632	GGGGCTGGGA	-632	KRGGCKRRK	-632	KRGGCKRRK
	-104	GGGCGGGGC	-104	GGGCGGGGC	-104	GGGCGGGGC

K is G/T, R is A/G.



**Fig. 6.** Expression of Sp1 and MAPKs in GCDCA-treated cells. (A) Effect of the administration of MnTBAP or MitoQ (12 h). Representative western blots for (p-)Sp1 ( $n = 4$  and 5, respectively), p-JNK ( $n = 3$ ) and p-ERK1/2 ( $n = 3$ ) in HepG2 cell lysates. (B) Densitometry analysis of blots included in panel A. (C) Effect of the administration of Sp1 inhibitors, Tolfenamic acid (TA) and Mithramycin A (MitA) (6 h). Representative western blot for p-Sp1 ( $n = 3$ ) in cell lysates. (D) Densitometry analysis of blots included in panel C. In the densitometry analysis, the “+” sign indicates GCDCA-G- administration plus the showed treatment. Data as mean  $\pm$  SE. Statistically significant difference versus control group\* or versus GCDCA group# are marked.

### 3.4. Sp1 participates in NOS-3 downregulation during GCDCA-induced cytotoxicity

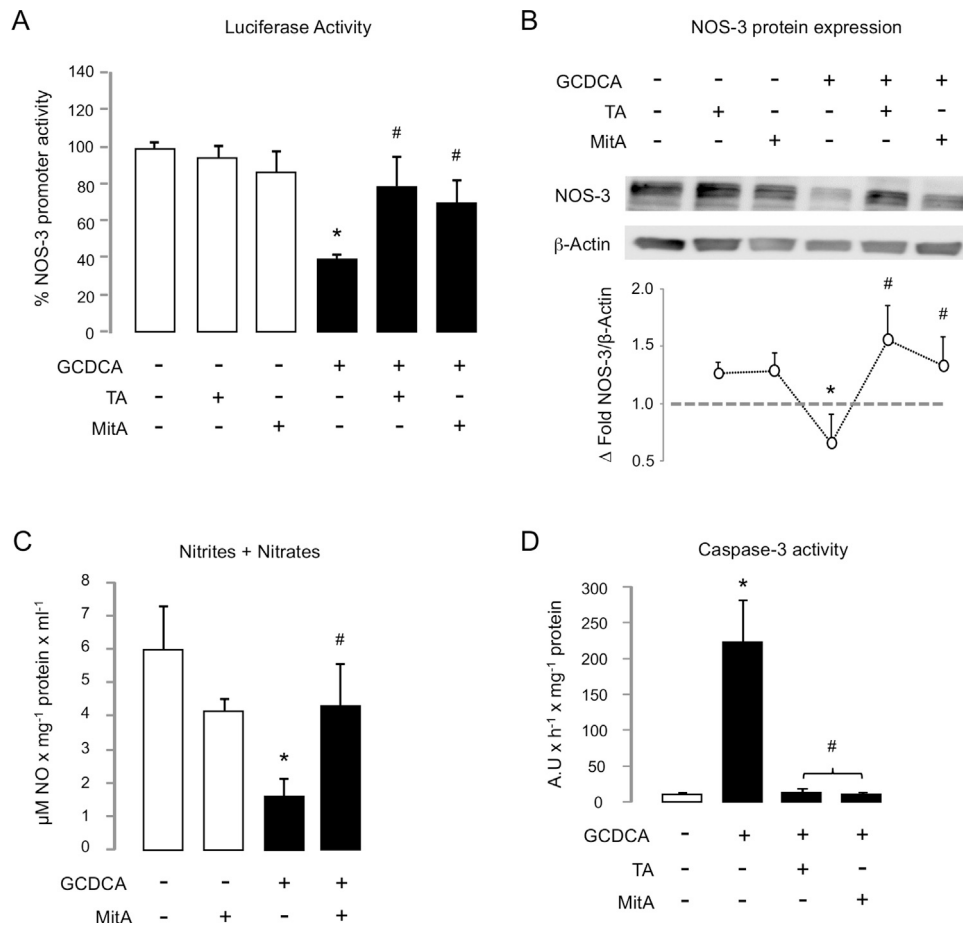
Then, we evaluated the involvement of Sp1 in the NOS-3 regulation during GCDCA-induced cell death by testing specific inhibitors TA and MitA. Fig. 6C and D shows the effect of TF inhibitors on the phosphorylation state of Sp1. Both of inhibitors were able to inhibit the GCDCA-induced activation of Sp1.

When we later investigated the effect of Sp1 inhibition in GCDCA-treated pGL4-NOS3 cells, we found that both TA and MitA were able to restore the pNOS-3 transcriptional activity (Fig. 7A)

and the NOS-3 protein expression (Fig. 7B). This fact was related to a higher extracellular concentration of NO-oxidation end products (Fig. 7C) and to a marked reduction on caspase-3 activity (Fig. 7D). No additional effect on pNOS-3 activity was observed when Sp1 inhibitors were combined (data not shown).

### 3.5. GCDCA increases Sp1 binding to pNOS-3

In order to test the effect of GCDCA administration on the Sp1 binding capacity to the pNOS-3 sequence, we performed ChIP assay. We selected the three candidates Sp1 binding sites

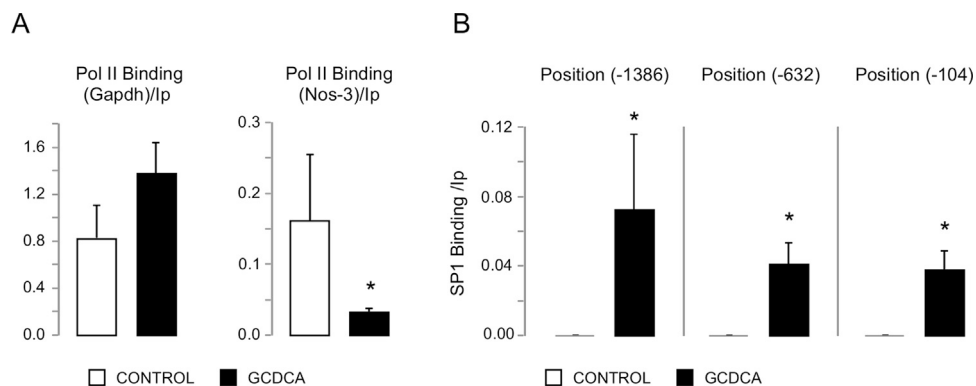


**Fig. 7.** Role of Sp1 in NOS-3 regulation during cytotoxicity by GCDCA. Cells not exposed/exposed to GCDCA were treated with Tolfenamic acid (TA) or Mithramycin A (MitA). (A) NOS-3 promoter activity ( $n = 6$ ). (B) NOS-3 protein expression ( $n = 3$ ). (C) NO-related end products ( $n = 3$ ). (D) Caspase-3 activity ( $n = 4$ ). Parameters were determined at 6 h (A, B, D) and 24 h (C) after treatment. Data expressed as mean  $\pm$  SE. Statistically significant difference versus control group\* or versus GCDCA group# are marked.

identified at positions  $-1386$ ,  $-632$  and  $-104$  of the pNOS-3 (Table 1 and Fig. 1), and we used GAPDH and NOS-3 as positive controls of immunoprecipitation and gene expression, respectively (Fig. 8A). Immunoprecipitation of samples from HepG2 cells with anti-Sp1 antibody showed binding of Sp1 at positions  $-1386$  ( $p = 0.049$ ),  $-632$  ( $p = 0.034$ ) and  $-104$  ( $p = 0.034$ ) of the pNOS-3 after GCDCA administration (Fig. 8B). No binding of Sp1 to the pNOS-3 was detected at basal condition.

### 3.6. The *in vivo* model of cholestasis reproduces the GCDCA model in HepG2 cells

Biliary obstruction increased total and direct bilirubin, and hepatic injury markers GGT, AST and ALT in serum from rats as a consequence of cholestasis (Bile Duct Ligated group, BDL;  $p < 0.001$ ) (Table 2). In the same way, the *in vivo* model of cholestasis was associated with: (A) macrophage invasion; (B)



**Fig. 8.** Sp1 binding to the NOS-3 promoter. (A) Gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and NOS-3 as positive controls. (B) Enrichment of Sp1 binding to the NOS-3 promoter at positions  $-1386$ ,  $-632$  and  $-104$ . Data expressed as mean  $\pm$  SE of three independent experiments. Statistically significant difference versus control group is marked\*.



**Table 2**  
Serum markers of liver function and cholestasis.

	GGT (IU/l)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	TB (mg/dl)	DB (mg/dl)
SO group	4 ± 0	62.92 ± 2.74	44 ± 6.65	0.13 ± 0.013	0.1 ± 0
BDL group	52.38 ± 6.90*	332.54 ± 45.71*	130.22 ± 17.85*	9.13 ± 0.86*	7.03 ± 0.66*

SO, Sham operated group ( $n = 13$ ); BDL, bile duct ligation group ( $n = 13$ ). Data expressed as mean ± SE ( $p \leq 0.05$ ). Statistically significant difference versus SO group is marked\*.

the expression decrease of antioxidant genes Sod1 (34%), Sod2 (57%), catalase (25%), Gpx1 (23%) and Gpx4 (38%) ( $p < 0.001$ ); (C) the increase of the ratio between the phosphorylated and non-phosphorylated forms of Sp1 (182%,  $p = 0.024$ ); (D) the inhibition of Nos-3 mRNA expression (83%,  $p = 0.001$ ) and (E) NOS-3 protein expression (83%,  $p = 0.034$ ); and (F) the increase of caspase-3 activity (166%,  $p = 0.033$ ) in liver tissue (Fig. 9).

Since the bile duct ligation induced the expression of the commonly used loading control proteins  $\beta$ -actin and GAPDH in the rat liver lysates (data not shown), we assessed the phosphorylated/non-phosphorylated protein ratio in the expression analysis of Sp1 in these samples (Fig. 9C). Similarly, the NOS-3 protein expression in the liver tissue was referred to the protein load (Fig. 9E).

#### 4. Discussion

Although bile salts are not oxidants *per se*, these have been related to oxidative damage and NOS-3 expression deregulation [6], which are considered two main events in the pathogenesis of CLD. Actually, both, oxidative stress and NOS-3 expression regulation, are processes that are closely related and can be regulated to each other. Thus, using antioxidants or molecular treatments related to NO release or the recovery of NOS-3 expression has proven therapeutic efficacy against hepatotoxicity by bile acids. In the present study, we have investigated the relationship between these two biological processes and we have identified Sp1 as a candidate TF involved in the NOS-3 expression regulation during CLD.

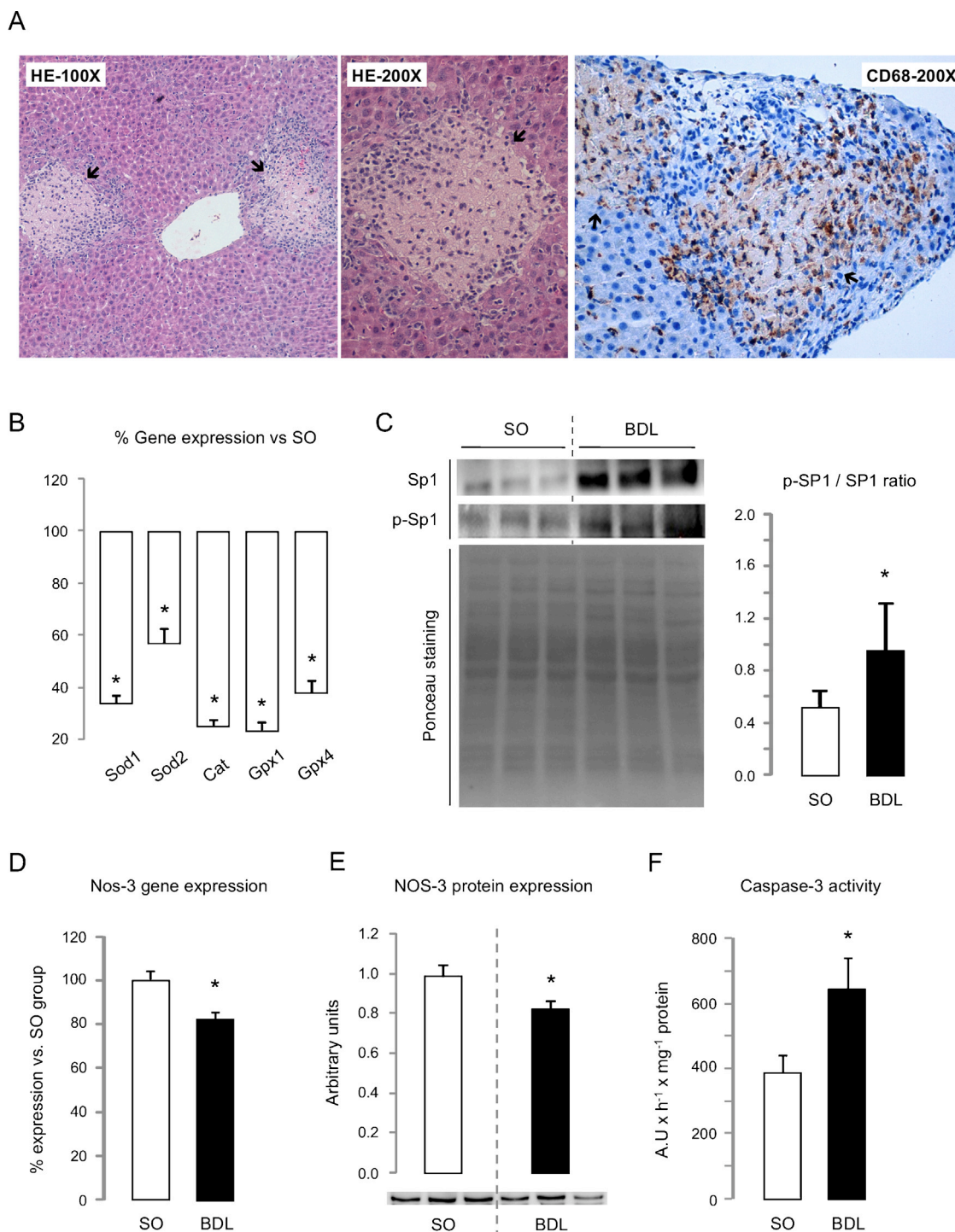
In our cell model of cholestasis, GCDCA triggered hepatocellular damage and caused a reduction in NOS-3 expression by altering cellular redox homeostasis. The administration of the bile salt was related to the decrease of the combined activity of respiratory complexes II + III (but not of complexes I + III), which indicates a failure in the electron flow between respiratory complexes II and III. In this regard, the electron leak at the ubiquinone-complex III site is considered the main source of ROS generation during bile acid-induced toxicity [20] since it enhances the formation of  $O_2^{\bullet-}$ , which is a precursor of most other ROS [21]. The effect of GCDCA on the activity of mitochondrial complexes II + III was consistent with that associated with CDCA in isolated mitochondria from rat liver. However, in that approach, OXPHOS system was more sensitive to the non-conjugated form of the bile acid at lower concentrations. [22] As expected, oxidative stress prevention by administration of the cell permeable SOD mimetic MnTBAP was associated with the gene expression recovery of the cellular antioxidant system and the increase of the NOS-3 expression and activity. This resulted in an increase in cell survival as measured by the decrease on caspase-3 activity and LDH release. Concerning the use of MnTBAP as a specific superoxide scavenger, it should be noted that non-porphyrin Mn species that appears as impurities in commercial MnTBAP preparations exhibit SOD-like activity and are very effective in dismuting  $O_2^{\bullet-}$  [23,24]. Furthermore, the administration of ubiquinone through the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ also recovered the activity of the pNOS-3. According to the literature, MitoQ caused the activity recovery of the respiratory complex II + III [14] in the presence of GCDCA. This was related to oxidative stress reduction, NOS-3 protein increase and cellular

protection against GCDCA [9]. NOS-2 gene expression was not detected before or after GCDCA treatment (data not shown).

Functional characteristics of the human pNOS-3 are extremely complex, and particularly interrelation among cis-elements remains to be elucidated. Different conditions involved in the generation of oxidative stress may up-regulate [25] or down-regulate [26] the pNOS-3. However, there is no evidence about the elements involved in the regulation of NOS-3 expression during GCDCA-induced cytotoxicity. Bioinformatic analysis of the pNOS-3 sequence identified different TFBS for Sp1. This was particularly interesting because Sp1 is a redox-sensitive TF involved in a variety of cellular processes including the NOS-3 expression regulation [27–29] and the bile acid-induced cell apoptosis [30]. The cellular response to GCDCA was characterised by the increase of expression and activation of Sp1 (which was associated with the activation of MAPKs JNK and ERK1/2) and by a greater binding capacity of this to the TFBS identified in the pNOS-3 at positions –1386, –632 and –104. This resulted in a decrease of pNOS-3 activity and NOS-3 protein expression. The administration of MnTBAP significantly reduced the GCDCA-dependent activation of Sp1, and caused the recovery of the pNOS-3 transcriptional activity and NOS-3 expression, the accumulation of NO end-products nitrates and nitrites, and the reduction of cell death related parameters. Similarly, MitoQ reduced the expression and/or activation of Sp1 and induced the pNOS-3 activity, which was related to the NOS-3 expression/activity increase and the cell survival [9]. This is consistent with a model of gene expression regulation by oxidative stress instead of direct interaction with TFs [31], and agrees with the MAPKs regulation mechanism through oxidative stress induced by bile acids [32].

Sp1 binding to the pNOS-3 has been related to NOS-3 up-regulation induced by cytotoxicity [33] or by free radical scavenging [34]. Kumar et al. demonstrated that Sp1 binding to the pNOS-3 regulates the promoter activity in response to oxidative stress [26]. However, in that report, the addition of  $H_2O_2$  decreased the promoter activity by reducing the binding capability of Sp1. Here, we also observed a promoter activity decrease as a consequence of a higher intracellular production of ROS, but it was associated with an increase of Sp1 binding to the pNOS-3. The specific inhibition of Sp1 with TA (which induces the degradation of Sp1, Sp3 and Sp4) [35] or MitA (which selectively displace Sp1 from its binding site) [36,37] resulted in cellular protection against GCDCA-induced cell death through the same mechanism described above for the antioxidants. Thus, Sp1 inhibition caused the recovery of the pNOS-3 activity and the NOS-3 expression in GCDCA-treated HepG2 cells. These results suggest that Sp1 is not essential for NOS-3 expression. Actually, Sp1 could function as a transcriptional repressor of NOS-3 gene expression through direct binding to the promoter sequence at positions described above. In this regard, it should be noted that histone deacetylase 1 (HDAC1) plays a critical role in the NOS-3 repression [38] through its direct binding to Sp1 [39]. Interestingly, the pNOS-3 activity can be also regulated by methylation [40], which is a process that is associated with histone deacetylation [41].

In the model of experimental cholestasis *in vivo*, the reduction of the cellular antioxidant status (which reflects a liver response to



**Fig. 9.** Animal model of cholestasis. (A) CD68 expression was analysed by immunohistochemistry in order to confirm the presence or absence of macrophage invasion previously evaluated by HE staining. The macrophage invasion foci are marked with arrows. The number of positive cases in SO group ( $n = 13$ ) and BDL group ( $n = 13$ ) were 1 and 10, respectively. (B) Expression levels of antioxidant genes Sod1, Sod2, catalase, Gpx1 and Gpx4. (C) Representative images for Ponceau staining and western blots for (p-)Sp1. The densitometry analysis of blots is showed as the ratio p-SP1/SP1. (D) NOS-3 mRNA expression. (E) Representative western blot for NOS-3 expression (SO group,  $n = 10$ ; BDL group,  $n = 10$ ). (F) Caspase-3 activity. Data expressed as mean  $\pm$  SE. Representative Western blot images include three independent samples from each group. Statistically significant difference versus SO group is marked\*.

oxidative stress) was related to the activation of Sp1, the inhibition of NOS-3 expression and the hepatocellular damage. Bile duct ligation induced the expression of proteins  $\beta$ -actin and GAPDH. This result is not surprising since the hepatic cholestasis was associated with tissue fibrosis [15], and liver fibrosis has been previously linked to changes in the expression of commonly used

loading control proteins [42,43]. We have previously shown that NOS-2 overexpression in the BDL group is associated with the hepatocellular injury [15]. According to the results of the present study, the adverse effects exerted by NO during cholestatic injury might be due to both the increase in NOS-2 and the reduction in NOS-3 expression. This agrees with the reported during the

progression of liver fibrosis [44]. Here, we found evidences for macrophage invasion in liver tissue sections from BDL animals. This observation was interesting because activated macrophages are an important source of ROS [45] and NOS-2-derived NO [46], and have been associated with many inflammatory models of liver injury. Thus, it is generally accepted that innate immune cells including Kupffer cells and infiltrating macrophages are activated after liver damage and can deteriorate the initial liver injury [47]. Because of this, we cannot rule out a significant role for macrophage invasion in the NOS-3 expression regulation by oxidative stress during cholestasis, or in the change of NOS-2/NOS-3 expression ratio during the progression of chronic liver injury.

In summary, GCDCA-induced oxidative stress was related to: (1) the expression and activation increase of Sp1, (2) the increased binding of Sp1 to the pNOS-3 at described positions, (3) the decrease of the NOS-3 promoter activity and the NOS-3 protein expression and associated activity, and (4) the cell death. In the cellular model of cholestasis, the inhibition of Sp1 was related to cell survival. Further investigation is required to determine the therapeutic value of Sp1 inhibitors for the treatment of cholestatic liver diseases. In this regard, it is important to note that TA is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) whose side effects include dose-related gastrointestinal toxicity [48] and drug-induced liver injury [49]. On the other hand, the antibiotic MitA causes undesirable toxic side effects at doses commonly used to treat different diseases [50,51]. Therefore, care should be taken when assessing the therapeutic power of these drugs. The regulation of Sp1 by oxidative stress and the involvement of NOS-3 in this process represent a new mechanism by which the accumulation of bile acids causes a cytotoxic effect, and provides a new potential therapeutic target for CLD.

## Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (grant number PI05/0703). G. Ferrín was supported by the Biomedical Research Centre Network Digestive and Liver Diseases (CIBEREHD).

## Acknowledgment

We thank the Dr. Huige Li from the Department of Pharmacology of Johannes Gutenberg University (Mainz, Germany) for providing us with the NOS-3 promoter sequence.

## References

- [1] M.E. Guicciardi, G.J. Gores, Cholestatic hepatocellular injury: what do we know and how should we proceed, *J. Hepatol.* 42 (2005) 297–300.
- [2] M.M. Tiao, T.K. Lin, C.W. Liou, P.W. Wang, J.B. Chen, F.Y. Kuo, et al., Early transcriptional deregulation of hepatic mitochondrial biogenesis and its consequent effects on murine cholestatic liver injury, *Apoptosis* 14 (2009) 890–899.
- [3] B. Yerushalmi, R. Dahl, M.W. Devereaux, E. Gumprecht, R.J. Sokol, Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition, *Hepatology* 33 (2001) 616–626.
- [4] M.G. Clemens, Nitric oxide in liver injury, *Hepatology* 30 (1999) 1–5.
- [5] D. Rockey, The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide, *Hepatology* 25 (1997) 2–5.
- [6] E. Biecker, J. Trebicka, A. Kang, M. Hennenberg, T. Sauerbruch, J. Heller, Treatment of bile duct-ligated rats with the nitric oxide synthase transcription enhancer AVE 9488 ameliorates portal hypertension, *Liver Int.* 28 (2008) 331–338.
- [7] K.C. Lee, Y.Y. Yang, Y.T. Huang, F.Y. Lee, M.C. Hou, H.C. Lin, et al., Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability, *Clin. Sci. (Lond.)* 119 (2010) 45–55.
- [8] S. González-Rubio, C.I. Linares, R.I. Bello, R. González, G. Ferrin, A.B. Hidalgo, et al., Calcium-dependent nitric oxide production is involved in the cytoprotective properties of n-acetylcysteine in glycochenodeoxycholic acid-induced cell death in hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242 (2010) 165–172.
- [9] S. Gonzalez-Rubio, A.B. Hidalgo, G. Ferrin, R.I. Bello, R. Gonzalez, M.D. Gahete, et al., Mitochondrial-driven ubiquinone enhances extracellular calcium-dependent nitric oxide production and reduces glycochenodeoxycholic acid-induced cell death in hepatocytes, *Chem. Res. Toxicol.* 22 (2009) 1984–1991.

- [10] R. Gonzalez, A. Cruz, G. Ferrin, P. Lopez-Cillero, R. Fernandez-Rodriguez, J. Briceno, et al., Nitric oxide mimics transcriptional and post-translational regulation during alpha-tocopherol cytoprotection against glycochenodeoxycholate-induced cell death in hepatocytes, *J. Hepatol.* 55 (2011) 133–144.
- [11] D.A. Wink, K.M. Miranda, M.G. Espey, R.M. Pluta, S.J. Hewett, C. Colton, et al., Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide, *Antioxid. Redox Signal.* 3 (2001) 203–213.
- [12] M. Kelm, Nitric oxide metabolism and breakdown, *Biochim. Biophys. Acta* 1411 (1999) 273–289.
- [13] H.T. Chung, H.O. Pae, B.M. Choi, T.R. Billiar, Y.M. Kim, Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (2001) 1075–1079.
- [14] G.F. Kelso, C.M. Porteous, C.V. Coulter, G. Hughes, W.K. Porteous, E.C. Ledgerwood, et al., Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4588–4596.
- [15] L.M. Lopez-Sanchez, F.J. Corrales, M. Barcos, I. Espejo, J.R. Munoz-Castaneda, A. Rodriguez-Ariza, Inhibition of nitric oxide synthesis during induced cholestasis ameliorates hepatocellular injury by facilitating S-nitrosothiol homeostasis, *Lab. Invest.* 90 (2010) 116–127.
- [16] A. Wojtala, M. Bonora, D. Malinska, P. Pinton, J. Duszynski, M.R. Wieckowski, Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry, *Methods Enzymol.* 542 (2014) 243–262.
- [17] E. Fernandez-Vizcarra, M.J. Lopez-Perez, J.A. Enriquez, Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells, *Methods* 26 (2002) 292–297.
- [18] E. Lapuente-Brun, R. Moreno-Loshuertos, R. Acin-Perez, A. Latorre-Pellicer, C. Colas, E. Balsa, et al., Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain, *Science* 340 (2013) 1567–1570.
- [19] A. Fernandez-Alvarez, M. Soledad Alvarez, C. Cucarella, M. Casado, Characterization of the human insulin-induced gene 2 (INSIG2) promoter: the role of Ets-binding motifs, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 11765–11774.
- [20] H. Higuchi, G.J. Gores, Bile acid-mediated apoptosis in cholestasis, in: M. Trauner, P.L.M. Jansen (Eds.), *Molecular Pathogenesis of Cholestasis*, Eurekah.com/Landes Bioscience, NY, USA, 2004, pp. 126–134.
- [21] J.F. Turrens, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.* 552 (2003) 335–344.
- [22] S. Krahenbuhl, C. Talos, S. Fischer, J. Reichen, Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria, *Hepatology* 19 (1994) 471–479.
- [23] D.C. da Silva, G. DeFreitas-Silva, E. do Nascimento, J.S. Reboucas, P.J. Barbeira, M.E. de Carvalho, et al., Spectral, electrochemical, and catalytic properties of a homologous series of manganese porphyrins as cytochrome P450 model: the effect of the degree of beta-bromination, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1932–1941.
- [24] I. Batinic-Haberle, S. Cuzzocrea, J.S. Reboucas, G. Ferrer-Sueta, E. Mazzon, R. Di Paola, et al., Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-specific *Escherichia coli* model and carrageenan-induced pleurisy, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 192–201.
- [25] J. Min, Y.M. Jin, J.S. Moon, M.S. Sung, S.A. Jo, I. Jo, Hypoxia-induced endothelial NO synthase gene transcriptional activation is mediated through the tax-responsive element in endothelial cells, *Hypertension* 47 (2006) 1189–1196.
- [26] S. Kumar, X. Sun, D.A. Wiseman, J. Tian, N.S. Umaphathy, A.D. Verin, et al., Hydrogen peroxide decreases endothelial nitric oxide synthase promoter activity through the inhibition of Sp1 activity, *DNA Cell. Biol.* 28 (2009) 119–129.
- [27] P.A. Marsden, H.H. Heng, S.W. Scherer, R.J. Stewart, A.V. Hall, X.M. Shi, et al., Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 17478–17488.
- [28] F. Xing, Y. Jiang, J. Liu, K. Zhao, Y. Mo, Q. Qin, et al., Role of AP1 element in the activation of human eNOS promoter by lysophosphatidylcholine, *J. Cell Biochem.* 98 (2006) 872–884.
- [29] S. Wariishi, K. Miyahara, K. Toda, S. Ogoshi, Y. Doi, S. Ohnishi, et al., A SP1 binding site in the GC-rich region is essential for a core promoter activity of the human endothelial nitric oxide synthase gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216 (1995) 729–735.
- [30] H. Higuchi, A. Grambihler, A. Canbay, S.F. Bronk, G.J. Gores, Bile acids up-regulate death receptor 5/TRAIL-receptor 2 expression via a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway involving Sp1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 51–60.
- [31] H.M. Tse, M.J. Milton, J.D. Piganelli, Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: implication for their use in targeting oxidation-reduction reactions in innate immunity, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 233–247.
- [32] Y. Fang, S.I. Han, C. Mitchell, S. Gupta, E. Studer, S. Grant, et al., Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes, *Hepatology* 40 (2004) 961–971.
- [33] K. Cieslik, A. Zembowicz, J.L. Tang, K.K. Wu, Transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by lysophosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14885–14890.
- [34] J.W. Xu, K. Ikeda, Y. Yamori, Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment, *Hypertension* 44 (2004) 217–222.
- [35] M. Abdelrahim, C.H. Baker, J.L. Abbruzzese, S. Safe, Tolfenamic acid and pancreatic cancer growth, angiogenesis, and Sp protein degradation, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 855–868.
- [36] R.C. Snyder, R. Ray, S. Blume, D.M. Miller, Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters, *Biochemistry* 30 (1991) 4290–4297.

- [37] S.W. Blume, R.C. Snyder, R. Ray, S. Thomas, C.A. Koller, D.M. Miller, Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo, *J. Clin. Invest.* 88 (1991) 1613–1621.
- [38] Y. Gan, Y.H. Shen, J. Wang, X. Wang, B. Utama, X.L. Wang, Role of histone deacetylation in cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16467–16475.
- [39] A. Doetzlhofer, H. Rotheneder, G. Lagger, M. Koranda, V. Kurtev, G. Brosch, et al., Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 5504–5511.
- [40] Y. Chan, J.E. Fish, C. D'Abreo, S. Lin, G.B. Robb, A.M. Teichert, et al., The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 35087–35100.
- [41] P.L. Jones, G.J. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, et al., Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription, *Nat. Genet.* 19 (1998) 187–191.
- [42] M. Congiu, J.L. Slavin, P.V. Desmond, Expression of common housekeeping genes is affected by disease in human hepatitis C virus-infected liver, *Liver Int.* 31 (2011) 386–390.
- [43] H. Boujedidi, L. Bouchet-Delbos, A.M. Cassard-Douclier, M. Njike-Nakseu, S. Maitre, S. Prevot, et al., Housekeeping gene variability in the liver of alcoholic patients, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 36 (2012) 258–266.
- [44] T.M. Leung, G.L. Tipoe, E.C. Liong, T.Y. Lau, M.L. Fung, A.A. Nanji, Endothelial nitric oxide synthase is a critical factor in experimental liver fibrosis, *Int. J. Exp. Pathol.* 89 (2008) 241–250.
- [45] H. Jaeschke, Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 (Suppl. 1) (2011) 173–179.
- [46] C.J. Lowenstein, E. Padalko, iNOS (NOS2) at a glance, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 2865–2867.
- [47] H. Jaeschke, Mechanisms of liver injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (2006) G1083–G1088.
- [48] D. Bjorkman, Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated toxicity of the liver, lower gastrointestinal tract, and esophagus, *Am. J. Med.* 105 (1998) 17S–21S.
- [49] M.D. Leise, J.J. Poterucha, J.A. Talwalkar, Drug-induced liver injury, *Mayo Clin. Proc.* 89 (2014) 95–106.
- [50] L. Green, R.C. Donehower, Hepatic toxicity of low doses of mithramycin in hypercalcemia, *Cancer Treat. Rep.* 68 (1984) 1379–1381.
- [51] L.E. Nunez, S.E. Nybo, J. Gonzalez-Sabin, M. Perez, N. Menendez, A.F. Brana, et al., A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5813–5825.



RESEARCH ARTICLE

# AP-1 Inhibition by SR 11302 Protects Human Hepatoma HepG2 Cells from Bile Acid-Induced Cytotoxicity by Restoring the NOS-3 Expression

Sandra González-Rubio<sup>1</sup>, Clara I. Linares<sup>1</sup>, Patricia Aguilar-Melero<sup>1</sup>, Manuel Rodríguez-Perálvarez<sup>1,2</sup>, José L. Montero-Álvarez<sup>1,2</sup>, Manuel de la Mata<sup>1,2</sup>✉, Gustavo Ferrín<sup>1,2</sup>✉\*

**1** Maimonides Institute of Biomedical Research in Córdoba (IMIBIC), Reina Sofía University Hospital, University of Córdoba, Córdoba, Spain, **2** Biomedical Research Centre Network, Digestive and Liver Diseases (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Córdoba, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [gustavo.ferrin@imibic.org](mailto:gustavo.ferrin@imibic.org)



CrossMark  
click for updates

## OPEN ACCESS

**Citation:** González-Rubio S, Linares CI, Aguilar-Melero P, Rodríguez-Perálvarez M, Montero-Álvarez JL, de la Mata M, et al. (2016) AP-1 Inhibition by SR 11302 Protects Human Hepatoma HepG2 Cells from Bile Acid-Induced Cytotoxicity by Restoring the NOS-3 Expression. PLoS ONE 11(8): e0160525. doi:10.1371/journal.pone.0160525

**Editor:** Matias A Avila, University of Navarra School of Medicine and Center for Applied Medical Research (CIMA), SPAIN

**Received:** May 9, 2016

**Accepted:** July 20, 2016

**Published:** August 4, 2016

**Copyright:** © 2016 González-Rubio et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

The harmful effects of bile acid accumulation occurring during cholestatic liver diseases have been associated with oxidative stress increase and endothelial nitric oxide synthase (NOS-3) expression decrease in liver cells. We have previously reported that glycocheno-deoxycholic acid (GCDCA) down-regulates gene expression by increasing SP1 binding to the NOS-3 promoter in an oxidative stress dependent manner. In the present study, we aimed to investigate the role of transcription factor (TF) AP-1 on the NOS-3 deregulation during GCDCA-induced cholestasis. The cytotoxic response to GCDCA was characterized by 1) the increased expression and activation of TFs cJun and c-Fos; 2) a higher binding capability of these at position -666 of the NOS-3 promoter; 3) a decrease of the transcriptional activity of the promoter and the expression and activity of NOS-3; and 4) the expression increase of cyclin D1. Specific inhibition of AP-1 by the retinoid SR 11302 counteracted the cytotoxic effects induced by GCDCA while promoting NOS-3 expression recovery and cyclin D1 reduction. NOS activity inhibition by L-NAME inhibited the protective effect of SR 11302. Inducible NOS isoform was not detected in this experimental model of cholestasis. Our data provide direct evidence for the involvement of AP-1 in the NOS-3 expression regulation during cholestasis and define a critical role for NOS-3 in regulating the expression of cyclin D1 during the cell damage induced by bile acids. AP-1 appears as a potential therapeutic target in cholestatic liver diseases given its role as a transcriptional repressor of NOS-3.

## Introduction

Bile acids (BAs) are physiological detergents synthesized from cholesterol in the liver, which are required for absorption and transport of dietary fats and lipid-soluble vitamins, and disposal of toxic metabolites, drugs and xenobiotics. Cholestatic liver diseases (CLD) include a

group of disorders with different epidemiology, pathophysiology, clinical course and prognosis, sharing a defective BA formation and/or transportation from the liver to the intestine. Cholestasis may produce accumulation of toxic BAs in liver leading to hepatocellular apoptosis, which represents a key cellular mechanism for BA-mediated liver injury and progression of CLD towards fibrosis, cirrhosis and chronic liver failure [1] [2] [3]. Thus, the consequences of untreated cholestasis are severe and increase patient morbidity and mortality, and motivate liver transplantation in a significant proportion of patients.

Glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) is the major human hydrophobic BA [4] that has been held responsible for cholestasis-associated liver injury [5] [6]. By contrast, another physiological constituent of human bile, ursodeoxycholic acid (UDCA), has been demonstrated to exert anticholestatic effects in several cholestatic disorders and is the treatment of choice in primary biliary cirrhosis, which represents the leading cause of small-duct biliary diseases. The beneficial effect of UDCA has been associated with the inhibition of BA-induced hepatocyte and cholangiocyte apoptosis, and with improved patient survival. However, some considerations should be taken into account about using UDCA in the treatment of CLD. Thus, UDCA is frequently combined or replaced by other therapeutics agents such as corticosteroids, immunosuppressant and other drugs [6] [7].

Nitric oxide (NO) may behave either as a primary mediator of liver damage or as a potent protective agent against injury, depending on its concentration and generating source among other factors [8]. NCX-1000 is a NO-releasing derivative of UDCA that selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension, a common complication of CLD and a leading cause of death in patients with cirrhosis [9]. The endothelial nitric oxide synthase (NOS-3) is the main source of endogenous NO in the liver [10], and its expression may prevent liver damage [11]. Recently, we have shown that transcription factor (TF) SP1 negatively regulates NOS-3 expression during GCDCA-induced cholestasis through direct binding to the NOS-3 promoter (pNOS-3) in an oxidative stress dependent manner. In this regard, specific inhibition of SP1 resulted in the NOS-3 expression increase and the reduction of cell death-related parameters, and was proposed as a new potential target in CLD [12]. Here, we studied the involvement of new proposed TF binding sites (TFBS) for AP-1, GATA-1 and GATA-4 in the regulation of NOS-3 expression during experimental cholestasis in the human hepatocarcinoma cell line HepG2.

## Materials and Methods

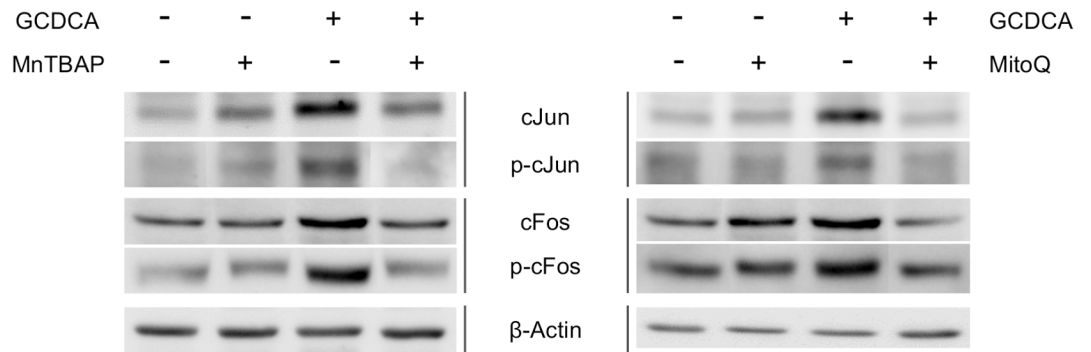
### Cell lines and culture conditions

HepG2 cell line (European Collection of Cell Cultures) was grown in EMEM (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) supplemented with 1 mM sodium pyruvate and 10% fetal bovine serum (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The pGL4-NOS3 cell line was obtained by stable transfection of HepG2 cells with the plasmid pGL4.20 [luc2/Puro] (Promega, Wisconsin, USA) containing the luciferase reporter gene under the control of the human pNOS-3 (1,601 nucleotides, GenBank accession no. AF387340.1; Fig 1). The control cell line pGL4 was obtained by stable transfection of HepG2 cells with the pGL4.20 [luc2/Puro] vector without promoter sequence insertion [12].

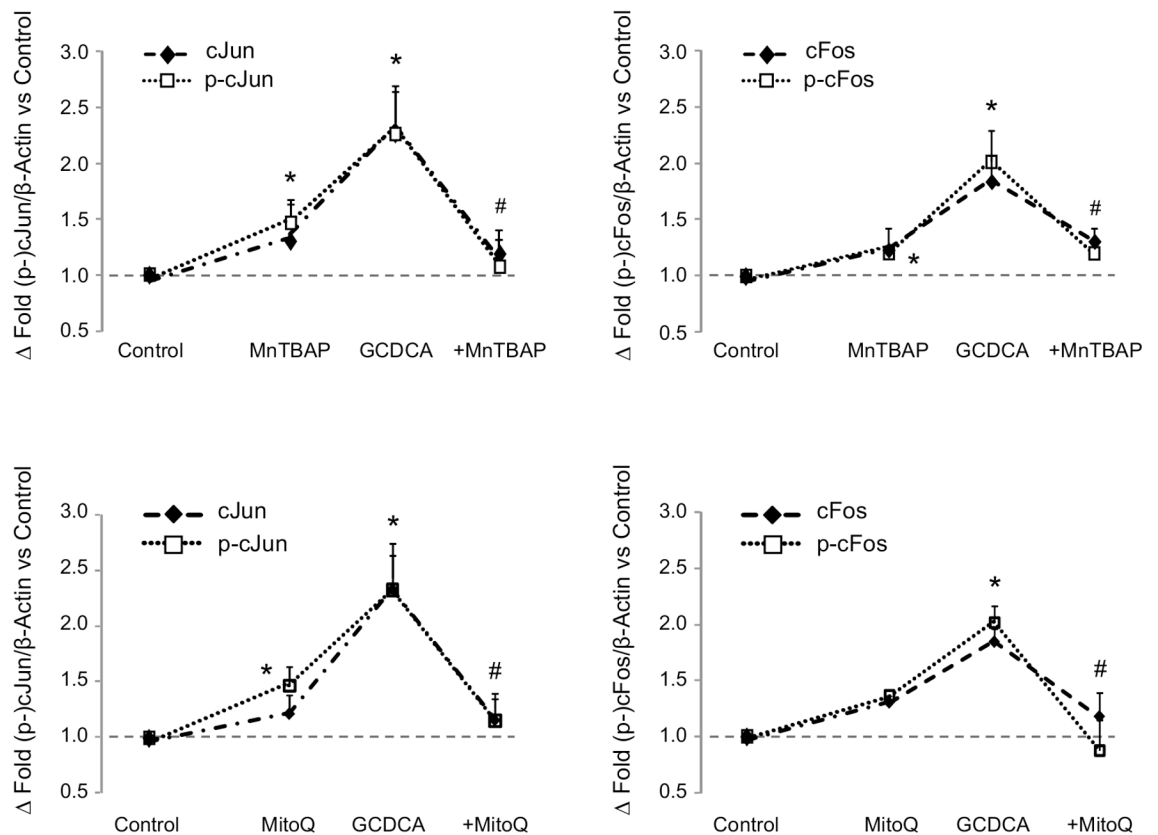
### Experimental procedure

Cells were plated at 150,000 cells/cm<sup>2</sup> and 0.5 mM GCDCA (Sigma-Aldrich) was administered after 48 h of cell culture. The SOD mimetic MnTBAP (manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride) (Calbiochem, Darmstadt, Germany) and the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ were administered at concentration of 0.1 mg/ml and 1 μM, respectively.

A



B



**Fig 1. Expression of transcription factors cJun and cFos in GCDCA-treated HepG2.** Effect of the administration of MnTBAP or MitoQ. (A) Representative western blots for cJun (n = 3), phospho-cJun (Ser63) (n = 4), cFos (n = 5) and phospho-cFos (Ser374) (n = 4). B-Actin was used as loading control. (B) Densitometry analysis of blots included in panel A. In the densitometry analysis, the + sign indicates GCDCA administration plus the showed treatment. Data as mean ± SE versus control group. Statistically significant difference versus control group\* or versus GCDCA group# are marked.

doi:10.1371/journal.pone.0160525.g001

Curcumin (diferuloylmethane), Quercetin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), the NOS inhibitor N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; Sigma-Aldrich) and the specific



AP-1 inhibitor SR 11302 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) were used at 4  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 5 mM and 50  $\mu$ M, respectively. Cells were harvested at different times according to the parameter under study. MitoQ was synthesized according to the procedure described by Kelso et al. [13].

### Growth measurements

Growth capacity and cell viability were determined by plating  $4 \times 10^5$  cells on 6 wells plates in 2 ml of the appropriate medium. Cells were incubated at 37°C for 5 days and cell counts were performed at daily intervals by the trypan-blue exclusion test. In order to quantify the number of dead cells accumulated during cell culture, the culture medium was removed and cells were washed with 10 mM PBS. Then, these two volumes were pooled and centrifuged at 2,500 rpm for 5 min, and the resulting pellet joined the pellet obtained after cell trypsinization.

Alternatively, cell proliferation was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, 14,300 cells were plated on 96 wells plates in 200  $\mu$ l of culture medium. For the measure, wells were washed with no supplemented cell culture medium and, after the addition of 50  $\mu$ l MTT (1 mg/ml), cells were incubated at 37°C for 2 h. Finally, MTT was carefully removed and insoluble formazan was resuspended in 100  $\mu$ l DMSO and spectrophotometrically measured at 570 nm with wavelength correction at 650 nm.

### Preparation of cell extracts

Protein extracts from HepG2 were obtained by incubating the cells in a lysis buffer containing 50 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml aprotinin and 10  $\mu$ g/ml leupeptin (Sigma-Aldrich). The integrity and concentration of protein samples were determined by the Ponceau staining and the Bradford method, respectively.

### Apoptotic cell death analysis

The apoptosis induction was assessed by the measure of caspase-3 activity in cell extracts as previously described [14]. Briefly, 50  $\mu$ g or 100  $\mu$ g of protein were diluted with caspase buffer (50mM Hepes pH 7.5, 100mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 1mM EDTA and 5mM DTT) and the reaction was started with the addition of 100  $\mu$ M Ac-DEVD-AFC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) (Bachem AG, Budendorf, Switzerland) in 100  $\mu$ l of total volume. The fluorescence increase due to enzymatic release of AFC ( $\lambda_{Ex}$  400nm,  $\lambda_{Em}$  505nm) was registered every 15 min for 2 h in a GENios Microplate Reader (TECAN). Data were reported as A.U  $\times$  h<sup>-1</sup>  $\times$  mg<sup>-1</sup> of protein.

### Luciferase reporter assay

The NOS-3 promoter activity was measured in pGL4-NOS3 and pGL4 cells by using the One-Glow Luciferase Assay System (Promega). Briefly, cells were plated in 384-well black microplates (15,000/well) and, after treatment administration, were lysed with 20  $\mu$ l of 1X Lysis Buffer. 40  $\mu$ l of cell extract were used for luciferase assay according to the manufacturer's recommendations.

### Protein expression analysis by Western-Blot

Between 20–100  $\mu$ g of protein from cell extracts were separated in a 10–12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and sequentially blotted against monoclonal or polyclonal primary antibodies. Primary antibodies were anti-NOS3 (sc-654, dilution 1:200), anti-cJun

(ref. sc-1694/X, dilution 1:2,000), anti-phospho-cJun (ref. sc-822, diluted 1:300), anti-cFos (ref. sc-52G, diluted 1:200), anti-phospho-cFos (ref. sc-81485, diluted 1:100), anti-phospho-SP1 (ref. ab37707, diluted 1:1,000), anti-cyclin D1 (ref. 2926, diluted 1:2,000) and  $\beta$ -Actin (ref. sc-47778, diluted 1:10,000). All antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (California, USA), except anti-phospho-SP1 (Abcam, Cambridge, UK) and anti-cyclin D1 (Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA). The densitometry analysis was performed by Quantity One software (v.4.4.0) (Bio-Rad, California, USA), using  $\beta$ -Actin signal as a loading control.

### Nitric oxide production

NO production was determined by the Griess reaction as we previously described [14]. In order to allow the accumulation of NO-related end products nitrates and nitrites, the cell culture medium was collected 24 h after the administration of the treatment. This ensured the sensitivity and reproducibility of the reaction. Nitrite concentrations were accurately determined by a nitrite calibration curve.

### Identification of Transcription Factors Binding Sites in the pNOS-3

The identification of theoretical TFBS in the pNOS-3 sequence was performed using the three different free online software tools for TFBS prediction: Transcription Factor Search (TFsearch v.1.3; <http://www.cbrc.jp.research/db/TFSEARCH.html>), Transcription Element Search System (TESS; <http://www.cbil.upenn.edu/tess>) and Transcription Factor Site Scan (TF site scan; <http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl>).

### Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)–RT-qPCR assay

ChIP-assays were performed as described in [15], using isolated nuclei from the formaldehyde-cross-linked HepG2 cells. Immunoprecipitation was performed using primary antibodies anti-cJun or anti-cFos, and magnetic beads (Dynabeads® Protein G, Life Technologies). RNA polymerase II (PolII) and normal rabbit IgG were used as positive and negative control, respectively, using antibodies anti-PolII (ref. sc-899) and anti-IgG (ref. sc-2027). 4  $\mu$ g of antibody was used for each experiment. All primary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. Purified samples were analysed by RT-qPCR, using SensiFast SYBR kit (Bioline, London, UK), and primers used to detect target sequences were as follows: -666 AP-1 site, 5'-CTTTTGTGTCCCCACTTGAG-3' and 5'-CAATTCCTGGAACCCAC-3'; -235 GATA-1/-4 site, 5'-AGGGCTCTGCTGGACACCT-3' and 5'-GCTGTGAGGACTGAGGCTGAT-3'. Primers to detect the NOS-3 (NM\_000603.4) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; NM\_002046.4) coding regions are summarized in [12]. For quantification purposes, a calibration curve was elaborated for each amplicon by 10-fold serial dilutions of the total input sample. Results were expressed as percent of input considering the input as 100% and the negative control as 0%.

### Statistical Analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of a minimum of 3 independent experiments. Data were compared by using the Kruskal-Wallis non-parametric method, and the Dunnett's T3 test for post-hoc multiple comparison analysis. Data from ChIP analysis, involving control and GCDCA-treated samples, were analysed by using the Mann-Whitney U test. Statistical comparisons were two-tailed, and significance was defined as  $p < 0.05$ . All tests and calculations were done with the statistical package StatView 5.0 (SAS Institute, Inc.) and SPSS 15.0 (IBM) for Windows.

## Results

### GCDCA-induced oxidative stress stimulates the expression and activation of cJun and cFos

Bioinformatic analysis of the pNOS-3 sequence identified candidate TFBS involved in the modulation of the NOS-3 expression. Only those sites identified by all the three software tools were selected for further analysis. We ignored the binding sites proposed for SP1, which were previously analysed in depth in the study by González-Rubio et al. [12]. Therefore, we considered TFBS for AP-1 and GATA-1 at positions described in Table 1.

To elucidate whether AP-1 (proteins cFos and cJun as constituent elements) was involved in the NOS-3 regulation during cytotoxicity mediated by GCDCA, we determined AP-1 expression and activation rates in HepG2 cells. GCDCA increased the expression of proteins cJun (233%,  $p = 0.024$ ) and cFos (185%,  $p = 0.006$ ), as well as their phosphorylation states (233%  $p = 0.035$ , 202%  $p = 0.009$ , and 200%  $p = 0.003$ , respectively). Cellular protection against oxidative injury was promoted by treatment with the antioxidants MnTBAP or mitoQ [12], which in turn reduced the expression and phosphorylation rates of TFs cJun and cFos during GCDCA-induced cytotoxicity (Fig 1).

### GCDCA increases cJun/cFos binding to pNOS-3

In order to test the effect of GCDCA administration on the AP-1 binding capacity to the pNOS-3 sequence, we performed ChIP assays. We selected a TFBS for AP-1 located at position -666 (Table 1). GAPDH and NOS-3 were used as positive controls of immunoprecipitation and gene expression, respectively (Fig 2A). Immunoprecipitation of samples from HepG2 cells with antibodies anti-cJun or anti-cFos showed binding of cJun ( $p = 0.021$ ) and cFos ( $p = 0.034$ ) at this position of the pNOS-3 after GCDCA administration (Fig 2B). Additionally, we tested the binding of TFs GATA-1 and GATA-4 at position -235 of the pNOS-3 (Table 1). However, GATA-4 did not bind to position -235 of pNOS-3 neither at basal conditions, nor after GCDCA administration. In addition, no significant differences were observed after GCDCA administration when we studied the binding of GATA-1 to the pNOS-3 (Fig 2C).

### AP-1 participates in NOS-3 downregulation during GCDCA-induced cytotoxicity

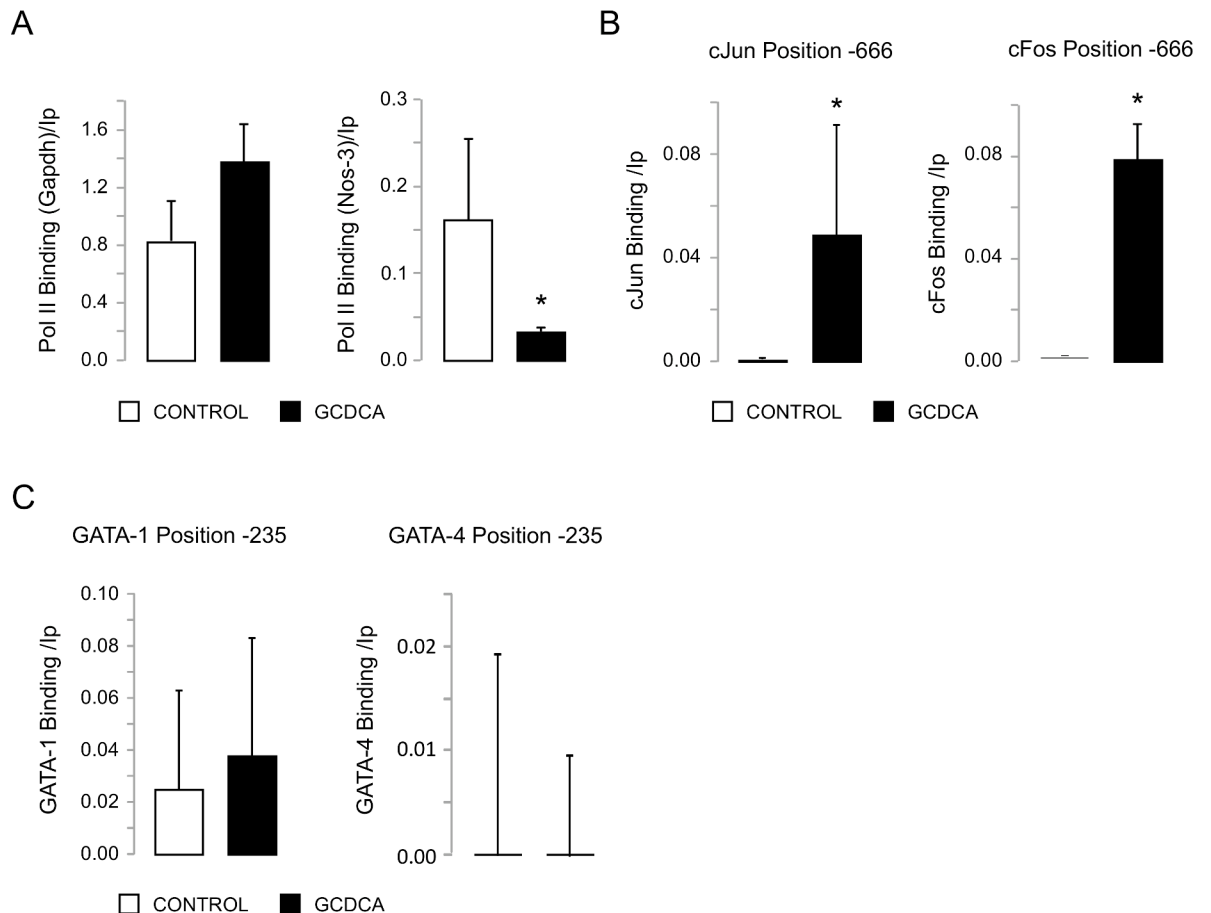
Then, we evaluated the involvement of AP-1 in the NOS-3 regulation during GCDCA-induced cell death by testing the TF inhibitors (TFIs) curcumin and quercetin. However, since these two compounds affected the phosphorylation state of the TF SP1 (Fig 3A), we also used the synthetic retinoid SR 11302 that is considered a specific inhibitor of AP-1. As Fig 3A shows, no significant effect on SP1 phosphorylation was detected when SR 11302 was used.

When we later investigated the effect of AP-1 inhibition in GCDCA-treated pGL4-NOS3 cells, we found that all assayed TFIs, curcumin, quercetin and the specific AP-1 inhibitor SR

**Table 1. Proposed transcription factor binding sites in the pNOS-3 region (1.6 Kb) for AP-1 and GATA-1.** TFSEARCH, TESS and TF SITE SCAN are free online software tools for the prediction of transcription factor binding sites. 'Position' makes reference to the pNOS-3 sequence (NCBI accession number GI: 14669582). W is A/T, M is A/C, S is C/G, K is G/T, R is A/G.

TF	TFSEARCH		TESS		TFSITESCAN	
	Position	Sequence	Position	Sequence	Position	Sequence
AP-1	-666	TTGAGTCAT	-665	TGAGTCA	-665	TGAGTCA
GATA-1	-235	CCACTTATCAGCCT	-232	CTTATCA	-232	WGATAMS

doi:10.1371/journal.pone.0160525.t001



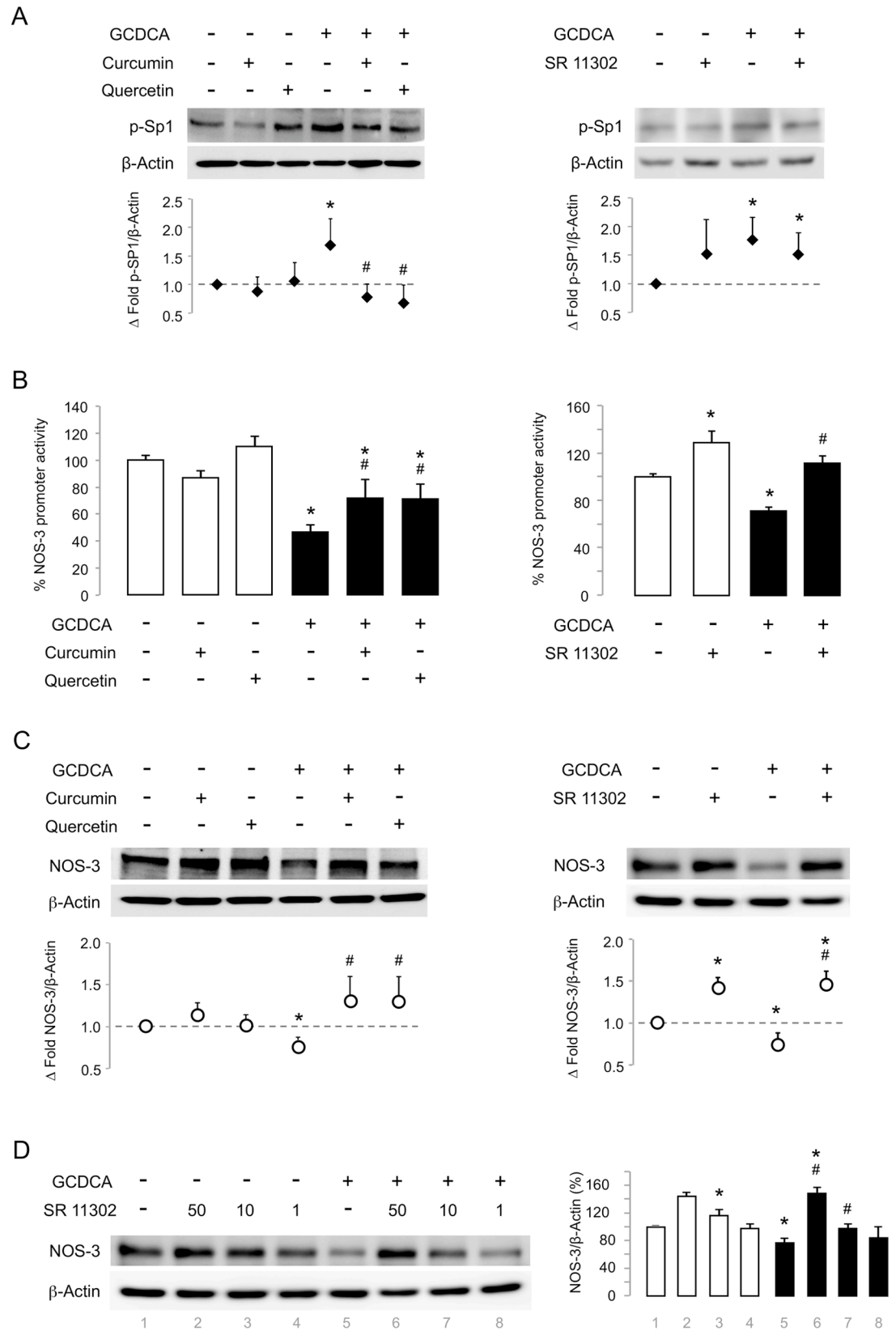
**Fig 2. Transcription factors cJun and cFos bind to the NOS-3 promoter after GCDCA administration.** (A) Gene expression of GAPDH and NOS-3 as positive controls. (B) Enrichment of cJun and cFos binding to the NOS-3 promoter (position -666) after GCDCA administration. (C) Evaluation of the binding of GATA-1 and GATA-4 to the NOS-3 promoter (position -235) after GCDCA administration. Data expressed as mean  $\pm$  SE of three independent experiments. Statistically significant difference versus control group (no GCDCA) is marked\*.

doi:10.1371/journal.pone.0160525.g002

11302, were able to restore the pNOS-3 transcriptional activity (Fig 3B). These findings were consistent with the NOS-3 protein expression increase (Fig 3C). Thus, the highest concentration of SR 11302 caused an increase of 148% in the NOS-3 expression during GCDCA administration when compared to control group (Fig 3D).

### Specific inhibition of AP-1 protects against the bile acid-induced apoptotic cell death

As shown in Fig 4, the NOS-3 expression recovery in GCDCA-treated HepG2 cells by the specific inhibition of AP-1 was related to a higher extracellular accumulation of NO-oxidation end products (Fig 4A), and associated with a dose-dependent reduction on caspase-3 activity (Fig 4B), which is involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis. These results are consistent with those shown for the non-specific AP-1 inhibition with curcumin or quercetin (Fig 4A and 4B). However, when we later analyse the cell doubling time after 96 hours of culture, it was  $41.7 \pm 3.3$  hours at basal condition,  $72.6 \pm 7.3$  hours with SR 11302 ( $p < 0.05$ ),  $65.0 \pm 9.1$  hours with GCDCA ( $p < 0.05$ ) and  $160.7 \pm 17.0$  hours after GCDCA plus SR 11302 administration ( $p < 0.05$ ) (Fig 4C). Thus, although the specific inhibition of AP-1



**Fig 3. AP-1 downregulates NOS-3 expression during cytotoxicity by GCDCA.** Cells not exposed (control group) / exposed to GCDCA (GCDCA group) were treated with Curcumin, Quercetin or the synthetic retinoid SR 11302. (A) Representative western blot for phospho-SP1 (Thr453) (Curcumin and Quercetin, n = 3; SR 11302, n = 7). (B) NOS-3 promoter activity (Curcumin and Quercetin, n = 6; SR 11302, n = 3). (C) NOS-3 protein expression (n = 3). (D) Dose-dependent NOS-3 expression recovery by SR 11302 during GCDCA cytotoxicity. SR 11302 was assayed at 50, 10 and 1  $\mu$ M. When no indicated, SR 11302 was used at 50  $\mu$ M. Densitometry analysis for panels (A), (C) and (D) are shown. Data expressed as mean  $\pm$  SE versus control group. Statistically significant difference versus Control group\* or versus GCDCA group# are marked.

doi:10.1371/journal.pone.0160525.g003

resulted in a drop of the duplication rate of the human hepatocarcinoma cell line HepG2, this was not associated with an increased caspase-3 activity (Fig 4B) or with cell death. Moreover, the higher concentration of SR 11302 significantly reduced the number of accumulated dead cells during cytotoxicity induced by GCDCA (Fig 4D).

In order to determine the involvement of NOS-3 expression recovery in the anti-apoptotic effect of SR 11302, we used the NOS inhibitor L-NAME. When it was combined with the retinoid, L-NAME inhibited the protective effect of SR 11302 during GCDCA cytotoxicity (Fig 5). Thus, while the NOS inhibitor *per se* had no effect on cell proliferation (Fig 5A) and cell death (Fig 5B), it significantly inhibited the caspase-3 activity decrease induced by SR 11302 during cholestasis (Fig 5B). L-NAME did also cause a cell doubling time increase in these conditions (Fig 5A). Similar results were obtained when we assessed the cell metabolic activity by the MTT assay (Fig 5A).

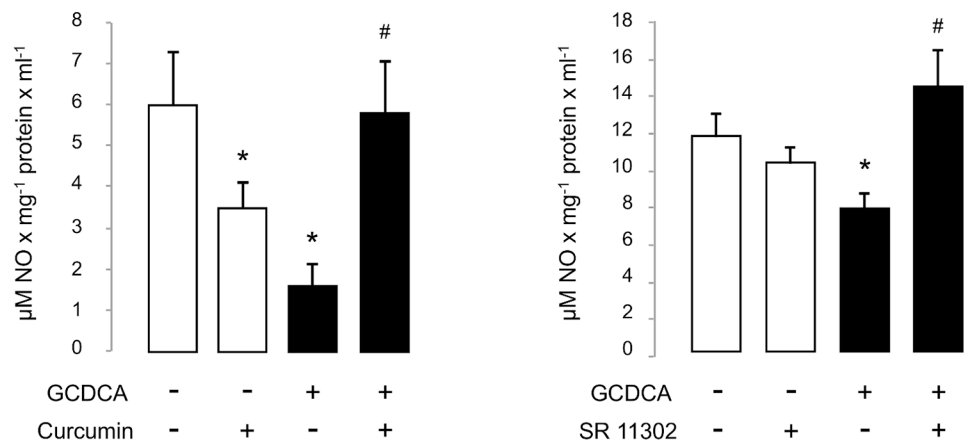
The antiproliferative capability of SR 11302 was related to the expression inhibition of cyclin D1, which is involved in the cell cycle progression (Fig 5C). Surprisingly, the toxic bile acid GCDCA induced the expression of cyclin D1 and not its inhibition as Fig 5A suggested. Under such circumstances, L-NAME inhibited the cyclin D1 expression decrease induced by the retinoid, just as previously noted for caspase-3 activity.

## Discussion

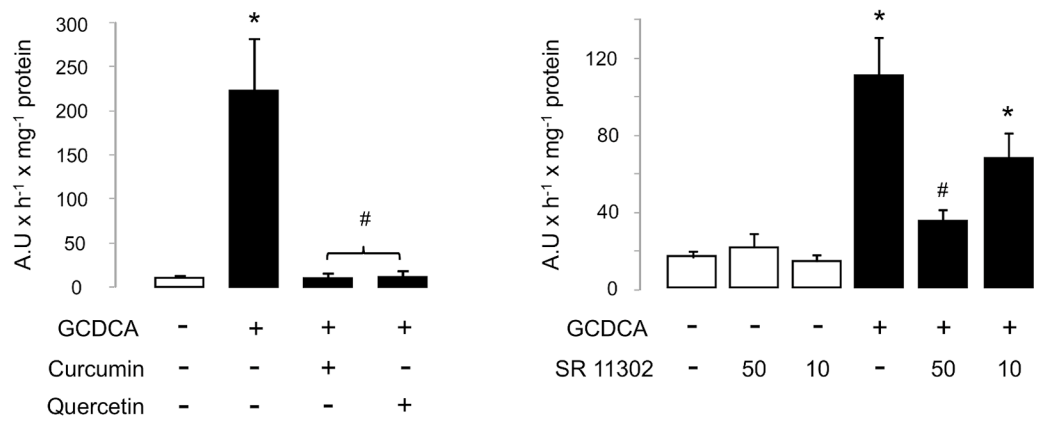
It has been previously reported that NOS-3 expression in the liver has a protective role. Different conditions involved in the generation of oxidative stress may regulate the pNOS-3 activity. Cholestasis is a disorder that is associated with oxidative damage and with the NOS-3 expression deregulation. In the model used in this study, GCDCA administration has been associated with a failure in the electron flow between respiratory complexes II and III, which is considered the main source of ROS generation during bile acid-induced toxicity. Recently, we have shown evidence about the involvement of SP1 in the oxidative stress-dependent regulation of pNOS-3 activity during GCDCA-induced cytotoxicity. Thus, SP1 negatively regulates the transcriptional activity of pNOS-3 and NOS-3 expression and activity [12].

In the present study, we have identified new TFBS candidates in the pNOS-3 sequence, which may be involved in the gene expression regulation by BAs. Among them, the binding site for AP-1 was particularly interesting because, as we previously noted for SP1, it is a redox-sensitive TF involved in a wide spectrum of cellular processes, including the NOS-3 expression regulation [16] and the BA-induced cell apoptosis [17]. Cellular response to GCDCA was characterised by an increased expression and activation of cJun and cFos, and increased binding of these factors to the TFBS identified within the pNOS-3 at position -666. These findings suggest that AP-1 complex binds at this position as a heterodimer, resulting in a decrease of pNOS-3 activity and NOS-3 protein expression. The administration of curcumin and quercetin as AP-1 inhibitors [18, 19] [19] reverted the NOS-3 expression decrease. However, since these two compounds have also been described as SP1 inhibitors [20] [21] with antioxidant properties [22] [23], and both, SP1 and oxidative stress, are related to NOS-3 expression regulation during

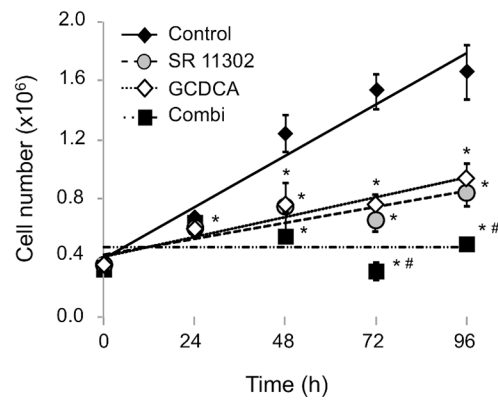
A



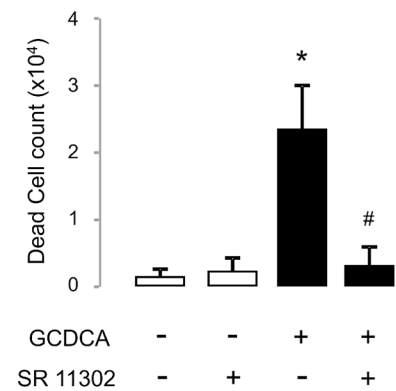
B



C



D



**Fig 4. NOS-3 activity recovery by AP-1 inhibition is associated with cell survival during experimental cholestasis.** Effects of AP-1 inhibition on (A) accumulation of NO-end products (n = 3), (B) caspase-3-associated activity (n = 4), (C) cell proliferation and (D) dead cell count (n = 3). In panel (B), SR 11302 was assayed at 50 and 10  $\mu$ M. When no indicated, SR 11302 was used at 50  $\mu$ M. Data expressed as mean  $\pm$  SE. Statistically significant difference versus control group\* or versus GCDCA group# are marked.

doi:10.1371/journal.pone.0160525.g004

cholestasis [12], these results could not be directly attributed to the inhibition of AP-1. As expected, the specific AP-1 inhibition by SR 11302 resulted in cell protection against GCDCA-induced cell death through the same mechanism previously described for antioxidant treatment or the SP1 inhibition. Thus, the retinoid recovered pNOS-3 activity and NOS-3 expression by inhibiting the AP-1 activity.

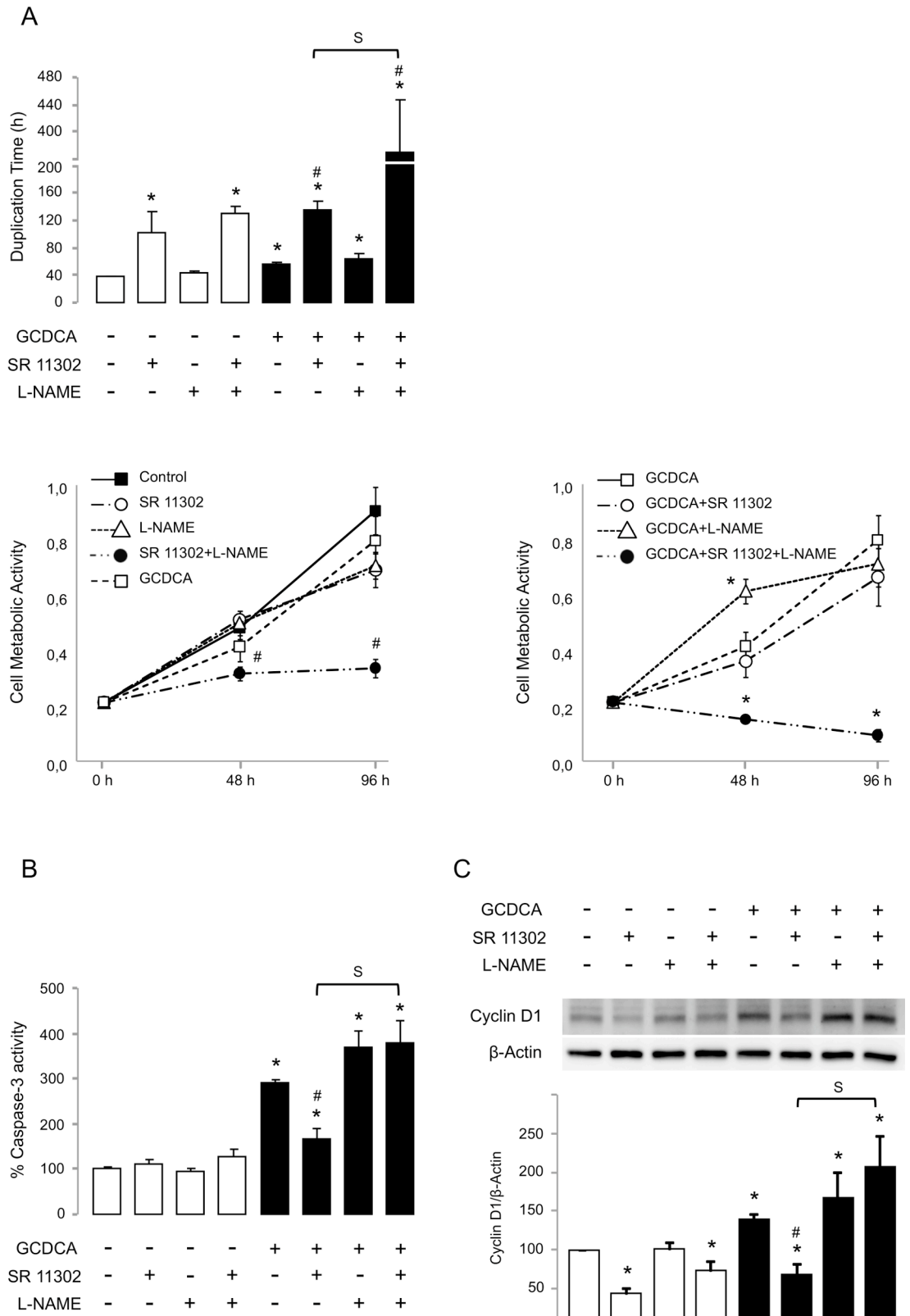
It has been reported that AP-1 is involved in NOS-3 up-regulation by cyclosporine A [24] or hypoxia [25], which are related to oxidative stress [26] [27]. Conversely, the antioxidant molecule nordihydroguaiaretic acid up-regulates NOS-3 expression through increase of AP-1 binding to the pNOS-3 in pulmonary arterial endothelial cells [28]. Kumar et al. demonstrated that AP-1 binding at the same pNOS-3 position reported in the present study regulated the promoter activity in response to oxidative stress [29]. However, in that report, the addition of hydrogen peroxide decreased the pNOS-3 activity by reducing AP-1 binding to the pNOS-3. Here, we also observed a promoter activity decrease as a consequence of higher intracellular production of ROS, but it was associated with an increase of AP-1 binding at that promoter position. This observation agrees with previous reports about the role of SP1 as transcriptional repressor of NOS-3 expression in the same cellular model of cholestasis [12]. In this regard, it is striking that AP-1 regulates numerous mammalian genes often in cooperation with TFs such as SP1. Interestingly, the AP-1 activity on the pNOS-3 was dependent on the presence of SP1, being both factors necessary to trigger pNOS-3 activation [30].

GATA binding to the pNOS-3 at position -235 was required to modulate SP1 activity during basal promoter activity [31]. Since the bioinformatic analysis identified a TFBS for GATA-1 in the pNOS-3 sequence, and GATA-4 binding at position -235 has been related to the pNOS-3 activity regulation [32], we additionally tested GATA-1 and GATA-4 binding at this position. However, we observed no promoter binding for GATA-4 or no binding differences for GATA-1 after GCDCA administration. Thus, if GATA binding to the pNOS-3 at position -235 was required to modulate SP1 activity during basal promoter activity, it did not involve GATA-4.

Our data illustrated that AP-1 may function as transcriptional repressor of NOS-3 gene expression through direct binding to the promoter sequence at position -666. To our knowledge, this is the first study that identifies an inhibitory role for AP-1 in the NOS-3 expression. However, this is not an exceptional case since overexpression of cJun and cFos in epithelial cells has been previously associated with a reduction of NOS-2 promoter activity [33]. Oxidative stress induced by GCDCA caused the activation of TFs cJun and cFos, and their binding to the pNOS-3 at position -666. This fact was related to the repression of promoter activity, the NOS-3 expression/activity decrease and cell death. In a model of experimental cholestasis *in vivo*, the observed hepatocellular damage was associated with the inhibition of NOS-3 expression and the activation of TFs cJun and cFos (data not shown). The regulation of cJun and cFos activities by oxidative stress and the involvement of NOS-3 in this process represent a new mechanism by which the accumulation of BAs causes a cytotoxic effect, and provides a new potential therapeutic target for CLD.

The biological activities of retinoids are believed to be mediated by transcriptional activation of retinoic acid response element (RARE) and inhibition of AP-1 activity. In cholestatic diseases, the addition of retinoic acid to UDCA might be an effective supplemental therapy with UDCA [34]. However, clinical use of retinoids is hampered by their adverse safety profile [35], which could be due to transcriptional activation of RARE. Thus, only AP-1 transrepression,





**Fig 5. NOS inhibition by L-NAME suppresses cell protection by SR 11302 during cholestasis.** Effect of inhibition of NOS activity on (A) cell doubling time (n = 6) and cell metabolic activity (n = 8); (B) caspase-3-associated activity

(n = 3); and (C) cyclin D1 expression (n = 4). SR 11302 was used at 50  $\mu$ M. In panel (A), only positive data for cell doubling time were used (n = 4 for group 'GCDCA + SR 11302', and n = 3 for group 'GCDCA + SR 11302 + L-NAME'). Data expressed as mean  $\pm$  SE. Statistically significant difference versus control group\* or versus GCDCA group<sup>#</sup> or between groups 'GCDCA + SR 11302' and 'GCDCA + SR 11302 + L-NAME' (S) are marked.

doi:10.1371/journal.pone.0160525.g005

but not RARE transactivation mediated by retinoids appears to be causally related to their anti-tumor activities [36]. Fortunately, a subset of synthetic retinoids are able to inhibit AP-1 activity without activating the transcription of RARE [36] [37], which have been previously proposed as therapeutic agents with reduced side effects. Thus, these retinoids are transcriptionally inactive and have lost the differentiating effects of retinoic acid, while retaining their antiproliferative properties, which come from the inhibition of AP-1 activity. SR 11302 belongs to this new class of retinoids and its use has been previously reported in human pathologies such as peritoneal inflammation [38] and cancer [36] [39]. In our experimental model of cholestasis, the inhibition of AP-1 by pharmacological blockade with SR 11302 was associated with protection from GCDCA-induced cell death by inhibiting caspase-3 activity. This is consistent with the previously reported study about the important role of apoptosis in the pathogenesis of liver injury during cholestasis, and the involvement of AP-1 upregulation in this process [17]. The administration of the commonly used NOS inhibitor L-NAME did inhibit the anti-apoptotic effect of SR 11302 during GCDCA treatment. This, together with the fact that no expression of NOS-2 was detected in our experimental model of cholestasis, suggests that NOS-3 regulation by AP-1 is a key process involved in the hepatocellular damage during cholestasis.

Although AP-1 activity can antagonize apoptosis in some tumor types such as liver tumors [40], and genes that encode Bcl2 family members have been proposed as anti-apoptotic targets regulated by the TF [41], inhibition of AP-1 by SR 11302 in HepG2 cells did not induce caspase-3 activity and it was not associated with the accumulation of dead cells. However, SR 11302 was related to the alteration of cell proliferation, which is consistent with its well-known antitumor capacity [36] [39]. At basal condition, the antiproliferative effect of SR 11302 was related to the expression inhibition of cyclin D1, a member of the cyclin family that is required for progression through the G1 phase of the cell cycle. However, although cyclin D1 promotes cell growth, overexpression of cyclin D1 can lead to premature G1-S phase transition and apoptosis [42]. In cholestasis, cyclin D1 overexpression has been implicated in toxic bile acid-induced Bax translocation, cytochrome c release and apoptosis of hepatocytes [43] [44]. Accordingly, the apoptosis induction by GCDCA was associated with the expression increase of cyclin D1. The inhibition of cyclin D1 expression by SR 11302 in our experimental model of cholestasis increased the cell doubling time (decreasing cell metabolic activity) but it significantly reduced the caspase-3 associated activity. Since NOS-3 expression was inhibited by GCDCA, the administration of L-NAME had no effect on cyclin D1 expression or cell proliferation. However, the NOS inhibitor counteracted the protective role of SR 11302, which is associated with the NOS-3 expression recovery. Thus, in the presence of L-NAME, the retinoid failed to reduce cyclin D1 expression and caspase-3 activity in GCDCA-treated HepG2 cells.

Taken together, our findings relate the toxic effects of bile acids with cyclin D1 overexpression through the NOS-3 expression inhibition by AP-1 (S1 Fig). The apparent safety of SR 11302 compared with other candidate agents such as mithramycin A or tolfenamic acid [12], makes the synthetic retinoid an interesting alternative therapeutic approach for CLD.

## Supporting Information

S1 Fig. NOS-3 expression inhibition by AP-1 is required to bile acid-induced cytotoxicity and is associated with cyclin D1 overexpression. GCDCA induces cell death by oxidative

stress-dependent AP-1 expression increase, NOS-3 downregulation and cyclin D1 overexpression. Antioxidant treatment inhibits AP-1 upregulation and cell death. AP-1 inhibition by SR 11302 reduces cell death by increasing NOS-3 expression/activity. NOS-3 activity inhibition by L-NAME is related to cyclin D1 expression increase and cell death.  
(TIF)

## Acknowledgments

We thank Dr. Huige Li from the Department of Pharmacology of Johannes Gutenberg University (Mainz, Germany) for providing us with the NOS3 promoter sequence. No specific funding was obtained to develop this study.

## Author Contributions

Conceptualization: MDLM GF.

Data curation: SGR GF.

Formal analysis: SGR GF MRP.

Investigation: MDLM GF SGR.

Methodology: SGR GF CIL PAM.

Supervision: MDLM GF.

Writing - original draft: SGR GF MDLM.

Writing - review & editing: SGR GF MDLM JLMA MRP.

## References

1. Hofmann AF. Cholestatic liver disease: pathophysiology and therapeutic options. *Liver*. 2002; 22 Suppl 2:14–9. PMID: [12220297](#)
2. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest*. 1998; 101:2790–9. PMID: [9637713](#)
3. Reinehr R, Graf D, Haussinger D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology*. 2003; 125:839–53. PMID: [12949729](#)
4. Tagliacozzi D, Mozzi AF, Casetta B, Bertucci P, Bernardini S, Di Ilio C, et al. Quantitative analysis of bile acids in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: a simple and rapid one-step method. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41:1633–41. PMID: [14708888](#)
5. Spivey JR, Bronk SF, Gores GJ. Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J Clin Invest*. 1993; 92:17–24. PMID: [8325981](#)
6. Galle PR, Theilmann L, Raedsch R, Otto G, Stiehl A. Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology*. 1990; 12:486–91. PMID: [2401454](#)
7. Liver EAftSot. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol*. 2009; 51:237–67. doi: [10.1016/j.jhep.2009.04.009](#) PMID: [19501929](#)
8. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology*. 1999; 30:1–5. PMID: [10385631](#)
9. Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, et al. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:8897–902. PMID: [11447266](#)
10. Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology*. 1997; 25:2–5. PMID: [8985256](#)

11. Biecker E, Trebicka J, Kang A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Heller J. Treatment of bile duct-ligated rats with the nitric oxide synthase transcription enhancer AVE 9488 ameliorates portal hypertension. *Liver Int.* 2008; 28:331–8. doi: [10.1111/j.1478-3231.2008.01664.x](https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01664.x) PMID: [18290775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18290775/)
12. Gonzalez-Rubio S, Lopez-Sanchez L, Munoz-Castaneda J, Linares CI, Aguilar-Melero P, Rodriguez-Peralvarez M, et al. GCDCA down-regulates gene expression by increasing Sp1 binding to the NOS-3 promoter in an oxidative stress dependent manner. *Biochem Pharmacol.* 2015; 96:39–51. doi: [10.1016/j.bcp.2015.04.017](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.017) PMID: [25931146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25931146/)
13. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem.* 2001; 276:4588–96. PMID: [11092892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11092892/)
14. Gonzalez-Rubio S, Hidalgo AB, Ferrin G, Bello RI, Gonzalez R, Gahete MD, et al. Mitochondrial-driven ubiquinone enhances extracellular calcium-dependent nitric oxide production and reduces glycocheno-deoxycholic acid-induced cell death in hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* 2009; 22:1984–91. doi: [10.1021/tx900327t](https://doi.org/10.1021/tx900327t) PMID: [20020783](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20020783/)
15. Fernandez-Alvarez A, Soledad Alvarez M, Cucarella C, Casado M. Characterization of the human insulin-induced gene 2 (INSIG2) promoter: the role of Ets-binding motifs. *J Biol Chem.* 2010; 285:11765–74. doi: [10.1074/jbc.M109.067447](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067447) PMID: [20145255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20145255/)
16. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993; 268:17478–88. PMID: [7688726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7688726/)
17. Bernt C, Vennegeerts T, Beuers U, Rust C. The human transcription factor AP-1 is a mediator of bile acid-induced liver cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340:800–6. PMID: [16380075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16380075/)
18. Huang TS, Lee SC, Lin JK. Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:5292–6. PMID: [1905019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1905019/)
19. Yokoo T, Kitamura M. Unexpected protection of glomerular mesangial cells from oxidant-triggered apoptosis by bioflavonoid quercetin. *Am J Physiol.* 1997; 273:F206–12. PMID: [9277581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9277581/)
20. Chadalapaka G, Jutooru I, Chintharlapalli S, Papineni S, Smith R 3rd, Li X, et al. Curcumin decreases specificity protein expression in bladder cancer cells. *Cancer Res.* 2008; 68:5345–54. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-07-6805](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6805) PMID: [18593936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18593936/)
21. Kim YH, Lee DH, Jeong JH, Guo ZS, Lee YJ. Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75:1946–58. doi: [10.1016/j.bcp.2008.02.016](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.02.016) PMID: [18377872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18377872/)
22. Vera-Ramirez L, Perez-Lopez P, Varela-Lopez A, Ramirez-Tortosa M, Battino M, Quiles JL. Curcumin and liver disease. *Biofactors.* 2013; 39:88–100. doi: [10.1002/biof.1057](https://doi.org/10.1002/biof.1057) PMID: [23303639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23303639/)
23. Lin SY, Wang YY, Chen WY, Chuang YH, Pan PH, Chen CJ. Beneficial effect of quercetin on cholestatic liver injury. *J Nutr Biochem.* 2014; 25:1183–95. doi: [10.1016/j.jnutbio.2014.06.003](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.003) PMID: [25108658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25108658/)
24. Navarro-Antolin J, Rey-Campos J, Lamas S. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene by cyclosporine A. A role for activator protein-1. *J Biol Chem.* 2000; 275:3075–80. PMID: [10652288](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10652288/)
25. Hoffmann A, Gloe T, Pohl U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol.* 2001; 188:33–44. PMID: [11382920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11382920/)
26. Wolf A, Trendelenburg CF, Diez-Fernandez C, Prieto P, Houy S, Trommer WE, et al. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 280:1328–34. PMID: [9067320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9067320/)
27. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009; 417:1–13. doi: [10.1042/BJ20081386](https://doi.org/10.1042/BJ20081386) PMID: [19061483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19061483/)
28. Kumar S, Wedgwood S, Black SM. Nordihydroguaiaretic acid increases endothelial nitric oxide synthase expression via the transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol.* 2007; 26:853–62. PMID: [17919072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17919072/)
29. Kumar S, Sun X, Wedgwood S, Black SM. Hydrogen peroxide decreases endothelial nitric oxide synthase promoter activity through the inhibition of AP-1 activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295:L370–7. doi: [10.1152/ajplung.90205.2008](https://doi.org/10.1152/ajplung.90205.2008) PMID: [18556800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18556800/)
30. Xing F, Jiang Y, Liu J, Zhao K, Mo Y, Qin Q, et al. Role of AP1 element in the activation of human eNOS promoter by lysophosphatidylcholine. *J Cell Biochem.* 2006; 98:872–84. PMID: [16453281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16453281/)
31. Zhang R, Min W, Sessa WC. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995; 270:15320–6. PMID: [7541039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7541039/)

32. Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 286:L452–9. PMID: [14555463](#)
33. Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodriguez-Pascual F, Geller DA, et al. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br J Pharmacol*. 1998; 125:193–201. PMID: [9776360](#)
34. He H, Mennone A, Boyer JL, Cai SY. Combination of retinoic acid and ursodeoxycholic acid attenuates liver injury in bile duct-ligated rats and human hepatic cells. *Hepatology*. 2011; 53:548–57. doi: [10.1002/hep.24047](#) PMID: [21274875](#)
35. Pfahl M, Apfel R, Bendik I, Fanjul A, Graupner G, Lee MO, et al. Nuclear retinoid receptors and their mechanism of action. *Vitam Horm*. 1994; 49:327–82. PMID: [7810073](#)
36. Li JJ, Dong Z, Dawson MI, Colburn NH. Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res*. 1996; 56:483–9. PMID: [8564958](#)
37. Fanjul A, Dawson MI, Hobbs PD, Jong L, Cameron JF, Harlev E, et al. A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature*. 1994; 372:107–11. PMID: [7969403](#)
38. Catar R, Witowski J, Wagner P, Annett Schramm I, Kawka E, Philippe A, et al. The proto-oncogene c-Fos transcriptionally regulates VEGF production during peritoneal inflammation. *Kidney Int*. 2013; 84:1119–28. doi: [10.1038/ki.2013.217](#) PMID: [23760290](#)
39. Huang C, Ma WY, Dawson MI, Rincon M, Flavell RA, Dong Z. Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:5826–30. PMID: [9159159](#)
40. Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, et al. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell*. 2003; 112:181–92. PMID: [12553907](#)
41. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:859–68. PMID: [14668816](#)
42. Han EK, Ng SC, Arber N, Begemann M, Weinstein IB. Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. *Apoptosis*. 1999; 4:213–9. PMID: [14634283](#)
43. Castro RE, Amaral JD, Sola S, Kren BT, Steer CJ, Rodrigues CM. Differential regulation of cyclin D1 and cell death by bile acids in primary rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 293:G327–34. PMID: [17431217](#)
44. Yang H, Li TW, Ko KS, Xia M, Lu SC. Switch from Mnt-Max to Myc-Max induces p53 and cyclin D1 expression and apoptosis during cholestasis in mouse and human hepatocytes. *Hepatology*. 2009; 49:860–70. doi: [10.1002/hep.22720](#) PMID: [19086036](#)







## Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201530577	
Fecha de recepción:	28 abril 2015, 18:20 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	900795	
Solicitante:	Servicio Andaluz de Salud	
Número de solicitantes:	3	
País:	ES	
Título:	Uso de derivados de ácido aureólico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la colestasis.	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (21 p.) Reivindicaciones.pdf (2 p.) Resumen.pdf (1 p.) Dibujos.pdf (8 p.) OLF-ARCHIVE.zip	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=Gustavo Fuster 26814	
Fecha y hora de recepción:	28 abril 2015, 18:21 (CEST)	
Codificación del envío:	3A:9E:61:98:AF:F1:5B:75:90:6D:A1:A0:08:AF:11:F3:80:D5:59:49	



---

A[\_!HX!PV^A0?=H[^W?=W^V^dP!!bAlI=W[AX=WV=PX!P^ [=W!P!WXA W=I^V^XZ [  
?=[HePW!H?ZcI^VA[=W!P!!c=I!XfP=T^V^AI[!IA?H=?^![A[^P[ZWXH^AI!  
^PWWH^X=W!P!!H!b^WXH=[!?AX!PX!W[!IA=!?@W^!P[=A@cAWcAW!W[![AX=W  
[!VAHeVX!H?gcI^V=hAVV!W^cI!W\_fAH![!W@ZP[^AI!W[!^PT=H@eX^VA>  
?.1.'(.3/(\$1.'3.1.'8\*4(\$%\$ '&\*#.'#1 '&\*3. =>!>?>@>

J@.%1,%9 =-,',\*. H\$ '\$4#&1.J



<p>(1) MODALIDAD:</p> <p style="text-align: center;"><b>PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD</b></p>	<p>[ ] [ ]</p>
<p>(2) TIPO DE SOLICITUD:</p> <p style="text-align: center;">PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL</p>	<p>[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]</p>
<p>(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:</p> <p style="text-align: center;">MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:</p>	
<p>4) LUGAR DE PRESENTACION:</p>	<p>OEPM, Presentación Electrónica</p>
<p>(5-1) SOLICITANTE 1:</p> <p style="text-align: center;">DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA</p> <p style="text-align: center;">NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME:</p> <p style="text-align: center;">DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:</p> <p>MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:</p> <p style="text-align: center;">INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESION:</p> <p style="text-align: center;">PORCENTAJE DE TITULARIDAD:</p> <p>(5-2) SOLICITANTE 2:</p> <p style="text-align: center;">DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA</p> <p style="text-align: center;">NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME:</p> <p style="text-align: center;">DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX:</p>	<p>Servicio Andaluz de Salud [ ]</p> <p>España ES Q9150013B</p> <p>Avda. de la Constitucion, 18 Sevilla 41 Sevilla 41071 España ES</p> <p>[ ] [ ] [ ]</p> <p>040,00 %</p> <p>Universidad de Córdoba [ ]</p> <p>España ES Q1418001B</p> <p>Avda. Medina Azahara, 5 Córdoba 14 Córdoba 14071 España ES</p>

	CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/>  PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 030,00 %
(5-3) SOLICITANTE 3:	DENOMINACIÓN SOCIAL: Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) UNIVERSIDAD PÚBLICA <input type="checkbox"/>  NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: G85296226 CNAE: PYME:  DOMICILIO: Monforte de Lemos, 5. Pabellón 11 LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28029 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/>  PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 030,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: Ferrín Sánchez NOMBRE: Gustavo NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 46816775-E
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: De la Mata García NOMBRE: Manuel NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 30439400-G
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: González Rubio NOMBRE: Sandra NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 46816775-E
(6-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS: Rodríguez Ariza NOMBRE: Antonio NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 30482007-S
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:	Uso de derivados de ácido aureólico en la elaboración de un medicamento para el

		tratamiento de la colestasis.
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERÍA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPÓSITO:  REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):		
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:  LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL:	APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE:  NÚMERO DE PODER:	Fúster Gustavo 1039/1
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 21 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 9 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 8 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de figura(s): 0 <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/>
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:
(18) NOTAS:		
(19) FIRMA:		

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:	Gustavo Fuster 26814
LUGAR DE FIRMA:	Madrid
FECHA DE FIRMA:	28 Abril 2015



<b>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS</b>		
<b>Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad</b>		
<b>1. REFERENCIA DE SOLICITUD</b>	<b>900795</b>	
<b>2. TASAS</b>	<b>Importe (en euros)</b>	
<b>Concepto</b>	<b>Código de barras asignado</b>	<b>Importe</b>
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	85016894384	63,68
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET		0,00
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	<b>Importe total</b>	63,68
	<b>Importe abonado</b>	63,68

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

## Uso de derivados de ácido aureólico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la colestasis.

### **CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso de inhibidores de la expresión del factor de transcripción Sp1, y más concretamente, se refiere al uso de mitramicina, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la colestasis.

### **10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La síntesis, secreción y reciclaje de las sales biliares representan las funciones del hígado cruciales para el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Durante la enfermedad hepática colestásica (CLD), los ácidos biliares tóxicos se acumulan en el suero y el hígado como consecuencia de su deficiente formación y la excreción en el canalículo de los hepatocitos, lo cual puede resultar en fibrosis, cirrosis e insuficiencia hepática crónica [1]. Se ha propuesto que el efecto deletéreo de la acumulación de ácidos biliares durante la colestasis está relacionada con el estrés oxidativo. Por lo tanto, la lesión hepática que se produce por la ligadura del conducto biliar se ha asociado con la disfunción mitocondrial, que es una importante fuente de especies reactivas del oxígeno (ROS), y perturbaciones en el sistema antioxidante [2] [3].

El óxido nítrico (NO) es un agente pleiotrópico bien conocido que influyen en múltiples aspectos de la fisiopatología hígado. Dependiendo de factores tales como su concentración o fuente de generación, el NO ha sido descrito como un mediador principal de daño hepático o como un potente protector contra la lesión hepática [4]. En el hígado, el NO pueden ser sintetizado por la actividad de las tres isoformas conocidas de la óxido nítrico sintasa (NOS), la isoforma endotelial (NOS 3) es considerada como la principal fuente de NO endógeno [5]. El uso de tratamientos moleculares asociados con el aumento de la de expresión de NOS-3 y la actividad en la CLD ha demostrado un efecto beneficioso para el hígado [6] [7]. Además, la administración de antioxidantes reduce la hepatotoxicidad de los ácidos biliares *in vitro* [8-10] e *in vivo* [3], a través de la prevención de la NOS-3 disminuir la expresión y la detoxificación de ROS [11]. Por lo tanto, la biorreactividad del NO mitiga el efecto de la producción de ROS [12]. Además de su papel en la desintoxicación ROS, el NO puede

actuar como un agente citoprotector mediante la inhibición de las caspasas a través de nitrosilación directa [13]. El ácido glucoquenodesoxicólico (GCDCA) es una sal biliar generada en el hígado a partir de ácido quenodesoxicólico y glicina, cuya toxicidad relativamente alta y la concentración en la bilis y el suero después de la colestasis ha ampliado su uso en modelos celulares de la enfermedad [8- 10]. Anteriormente, los autores de la presente invención han informado de que la expresión de NOS-3 se reduce en la línea celular de hepatocarcinoma HepG2 de humanos en respuesta a GCDCA, y que la recuperación de su expresión y la actividad está relacionada con la acción citoprotectora de moléculas antioxidantes[8] [9]. En la presente invención los autores han identificado a los elementos responsables de la regulación de la expresión de NOS-3 durante CLD, y han analizado el papel del estrés oxidativo en este proceso. Además, han aclarado los mecanismos moleculares subyacentes a la hepatocelular citotoxicidad relacionada con trastornos de colestasis lo que les ha permitido diseñar y desarrollar nuevas estrategias y tratamientos de intervención.

15

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Secuencia de nucleótidos del promotor NOS-3 humano. Secuencia de 1.601 bases de la región flanqueante 5 ' del gen NOS-3 humano (número de acceso GenBank AF387340.1). Círculos: codón de inicio ATG, y la posición -1 de los pNOS-3; Cajas: Sitios de Unión Sp1; Flechas: primers Foward/Reverse utilizados en los ensayos de ChIP.

**Figura 2. GCDCA induce estrés oxidativo y muerte celular en células HepG2.** (A) En general, la producción de ROS se cuantificó en lisados celulares mediante el uso de sondas fluorescentes DHE, H<sub>2</sub>DCFDA y ADHP (n=3). La muerte celular se evaluó mediante la medida de la actividad caspasa-3 (B) (n=5) y (C) la liberación de LDH (n=4). Los parámetros se determinaron a 6h(A) o 24 h (B y C) después de la administración de GCDCA y/o MntBAP. Los datos expresados como media  $\pm$  SE. La diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control\* o versus grupo GCDCA<sup>#</sup> están marcados.

**Figura 3. Desregulación de la actividad respiratoria y la expresión génica antioxidante en células tratadas con GCDCA.** (A) Actividad de los complejos respiratorios I, I+III, II, II+III y IV (n=6). La actividad citrato sintasa (CS) se utilizó como un normalizador. (B) Cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR (n=6). (C) Actividad del complejo respiratorio II+III (n=6). Las células no expuestas/expuestas a GCDCA se trataron con MntBAP o MitoQ los parámetros fueron determinados 6 horas después de la administración de GCDCA y/o MntBAP o MitoQ. Datos expresados como media  $\pm$  SED. Las diferencias



%&" .>(&)" 1 % (% &)?' )3+" (\*)" 3% (% ?\$ #/ . % +/' (\$ 0/ \*%&- & ZB@BW ?\$ #/ k %&:'  
1 " \$+." &=

DF, & N4; . %0#2# \$% %' 2" #J'\$)2(# '/ \$, +\$# 3#&E5: 56P>9BRM% .) %J3&%' -/ K  
) +2('\$) \$4ANCW+(\*). " . %0#\$ 1 / (/ \$NJ 8TL A g QG^A CM7#\$&), ' ?G )" . %NJ 8TL A gQG-  
5 ABCM7#\$&), ' . % 0 # \$ (%& " NJ 8TL A g LG^H\$ . - + (/ & 3' " 0& A@C\$0+) ' " . "& +/' %0  
NJ A gLG^! / &#" \$ 1 %(\$ & 3 %\$' . %(\$1) " . / &% U5 AN^49K5 A^C2 KQ5 AB 2 @C. %&#- G&0  
" . 1) ) &(\$ +), ' . % ZB@BW 2< h' b^WH= @ (/ & %7#\$& . / & +/ 1 / 1 %)" i 8M= !" &  
. )3/\$% +) & %&" .>(&)" 1 % (% &)?' )3+" (\*)" & 3% (% ?\$ #/ . % +/' (\$ 0 / \*%&- & ZB@BW ?\$ #/ k  
&:' 1 " \$+." &=

10 DF, & Q4; J3&%' -/ \$%B3GK768R" % .)" +! . .)" 2) 2\$)" +#/ E5: 564ANCMB/+/ . %  
0 " . 1) ) &(\$ +), ' . %h' b^WH / h) / n A9K5Go %&(\$ 60 (&\$#\$&%" (" /\* / &#" \$ #TC8#9A  
g Q2 S4\$&#%+(\*" 1 % (%&#TpNq A g LC2 #TM q9^KA g LC% 0 &Q& . / &. % +G0 0 &[ % #ZK=  
A^C W : Q&& . % . % & / 1 %\$' . % 0 & 60 (& ) +0) . / &% %0#" ' %0 W^ ABC M3/+/ . % 0  
" . 1) ) &(\$ +), ' . % ) 56). / \$& 8#94 : +). / (/ 0% : 1) +/ A^WC 2 h) (\$' 1) +) " W^h fbWCAU5G-  
15 o %&(\$ 60 ( \$#\$&%" (" /\* / #"\$ #TB#9 A g LC% Q& . / & +0 0 \$&= A@C W : Q&& . %  
. % & / 1 %\$' . % 0 & 60 (& ) +0) . / &% %0#" ' %0 B=M %0" : Q&& . % . % & / 1 %(\$' 4%0&)?' / |  
) . )" " . 1) ) &(\$ +), ' #0 & . %0 (\$ (" 1) % (/ ZB@BW 1 / &(\$' . / &% %0 (\$ (" 1) % (/ = @ (/ &  
+ / 1 / 1 %)" i 8M= !" &. )3/\$% +) & %&" .>(&)" 1 % (% &)?' )3+" (\*)" & 3% (% ?\$ #/ . % +/' (\$ 0 /  
\*%&- & ZB@BW ?\$ #/ k %&:' 1 " \$+." &=

20 DF, & S4 8) 3% \$% B3G % .) &F, .) + - / \$% > 9BRM \$, & / 2% .) +'2#2#J'+\$) \$ 3#&  
E5: 564 "& +G0 0 & ' / %7#- %& & %7#- %& / & " ZB@BW 3 %\$' (\$ (" . / & +/' : +). /  
( / 0% : 1) +/ A^WC / h) (\$' 1) +) " W^h fbW^AC" +(\*). " . %0#\$ 1 / (/ \$. %NJ 8TL A g UG^A C  
M7#\$&), ' . % 0 # \$ (%& " NJ 8TL A g LG^ ABC H\$ . - + (/ & 3' " 0& \$0+) ' " . "& +/' %0  
25 NJ A gLG^A@CW+(\*). " . + &#" & TL A gQG^H" \$ 1 %(\$ & 3 %\$' . %(\$1) " . / &% U5 AN^4@C2  
KQ5 ABC. %&#- G& . %0 (\$ (" 1) % (/ = @ (/ & %7#\$& . / & +/ 1 / 1 %)" i 8M= !" &. )3/\$% +) &  
& %&" .>(&)" 1 % (% &)?' )3+" (\*)" & 3% (% ?\$ #/ . % +/' (\$ 0 / \*%&- & ZB@BW ?\$ #/ k %&:'  
1 " \$+." &=

DF, & T4 ! / '- / B3G +#/ % 3&#1 #2#& \$% > 9BRM^ ANC M7#\$&), ' . % ?% %& . %  
?0+ %\$ 0 %> / LB 3' (/ . %&5). \$ ?% " & AZWH@ C2 NJ 8TL +/ 1 / +/' (\$ 0& #/ &)" /\* / &= A^C  
30 % \$F- %+) 1) % (/ . %8#9 . %- ' ), ' #"\$ # %0#\$ 1 / (/ \$NJ 8TL % 0 & #/ &+) ' %& TLXU4TULK 2 T  
9YQ= @ (/ & %7#\$& . / & +/ 1 / 1 %)" i 8M. % (\$& %7#\$& 1 % (/ & ) . % # % . % (%&= @3/\$% +) &  
& %&" .>(&)" 1 % (% &)?' )3+" (\*)" & 3% (% " 0? \$ #/ +/' (\$ 0 %&:' 1 " \$+." & j =

DF, & U4 7 #\$\$%# )/'1 ). \$% +#. %2 "" "4 ANC!" %7#\$\$&),' .% B@UX &% "" "QR #/ \$  
 ) 1 - ' / 5)&( F- >1 )+" + ' %03' .%+/' 3\$1 "\$0 #\$\$&%+) / "- &%+)" .%1 "+\$ 3 ?/ &)" \*" &,'  
 #\$\$%) 1 % (%%"0 ". #/ \$( ) +),' [ M= / &3 +/ &. %) \*" &,' .%1 "+\$ 3 ?/ &%&:' 1 "\$+." / &  
 +/ ' 3%+5" &= / &+" & &#/ &())\* / &% ?\$ #/ 8J A g 9LC2 ?\$ #/ ^@ A g 9LC3 %\$' .%9 2 9Y4  
 5 \$&#%+()\*" 1 % (%= A CN)\*%0& .% %7#\$\$&),' .% ?% %& "" (Y 7). "" (%& 8/ . 94 8/ . K4+" ("0 &" 4  
 Z#79 2 Z Hr Q= ABC b\$' &3\$%+) & o %&%\$ \$#\$&% ("()\* & #"\$ #TC 8#9= W : 0& & .%  
 .% &)/ 1 %\$' .%0 &60 (&&%1 / &\$ '\$' +/ 1 / 0 \$0+),' #B#9-8 H9-7@CM7#\$\$&),' .%W N1  
 N/ &TL=AMQW()\*). ". + " &#" & "L=@ ( / &%7#\$\$& . / &+ / 1 / 1 %) ) i 8M=f1 : ?% %&o %&%\$ T0 (  
 \$#\$&% ("()\* & ) +0 2% (\$& 1 - %&\$ & ) .%#% .% (%& .% + " . ?\$ #/ =!" & . )3\$%+) &  
 10 %& . > &)+ 1 % (%&?) 3+)" (\*" 3\$% (% " 0 F- %0? \$ #/ %&: 1 "\$+." / j=

: ; B5 C=35 =@> : ; <6 =>? ; >5 =@>

d' 3&1 %&)" 3%+2# .%0 #\$\$&% (%) \*%+),' &%\$%\$%\$% "0- & .% -' " +/ 1 #/ &+),' F- %  
 +/ 1 #\$\$% .% -' " ?% (%) 56). / \$. %&#94. %" 5/ \$' % " .%0' (%+ / 1 #/ &+),' .%0 ) \*%+),' 4  
 15 % 0 %0 6/ \$' +),' .% -' 1 %) + " 1 % ( / #"\$ \$' 0 #\$\$%+),' 41 %/ \$' 4" 0\* ) 2< (\$ (" 1 %) ( / .%0  
 +/ 0& (" &)= W0%\$ " (\*" 1 % (%4 &% \$%\$%\$% " -' " +/ 1 #/ &+),' F- % +/ 1 #\$\$% .% -' " ?% (%)  
 ) 56). / \$. %&#9 #"\$ \$' & - & % 0 #\$\$%+),' 41 %/ \$' 4" 0\* ) 2< (\$ (" 1 %) ( / .%0 +/ 0& (" &)=  
 M -' " \$% QR+),' #\$\$%\$%\$% .% %&% " &#%+(/ .%0 ) \*%+),' 4%0" ?% (%) 56). / \$. %&#9 %&  
 -' +/ 1 #- %&/ .%0? \$ #/ .%0: +). / "- \$% Q+ / =

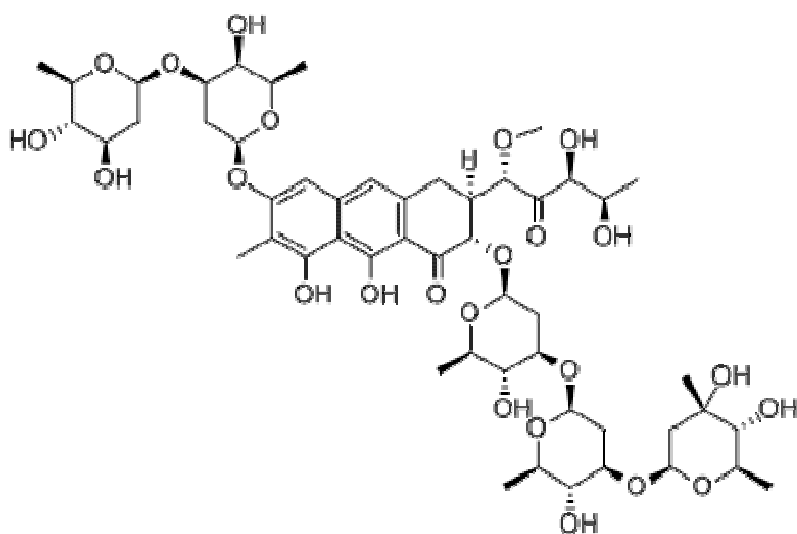
20 !" 3'1 0" .%0 :+). / "- \$% Q+ / +/ 1 #\$\$% .% " -' ?\$ #/ .% 1 %/" 6/ Q/ & &%+-' ."\$) &  
 &) (%R' . / &#/\$ 1 )% 6\$ & .%0?G %\$ 6" +(%\$) " / 8(\$#/ ( 1 2+%&=M&(" 3'1 0" %&: ) (%2\$' .  
 #/ \$0 1 )(\$' 1 )+)" An bh G0 & +\$ 1 / 1 )+)" &40 &/ 0\*/ 1 )+)" &40 +\$ 1 / +)+0 1 )+)" 4%0dB[ \\  
 20 .-\$5" 1 )+)" =

M&(\$ +(- \$' 01 % (%0 & +/ 1 #- %&/ & .%0? \$ #/ .%0: +). / "- \$% Q+ / #/ &%% -' " #"\$%+\$ 1 , 3 \$'  
 25 A?Q+, ' C .% / \$?% #/ Q+%,' )+ 3 \$1 ". #/ \$ (\$& "" )0 & A- (" \$ % %0 + " & .% 0  
 +\$ 1 / +)+0 1 )+)" C2 -' " +. % " 0 (%\$' 0" Q" 1 % (%3' +)' " QR' .% % %0+" \$6/ ' / L=b" 1 6)G  
 #\$\$&% (" A/ ' %7+%#+),' .%0 / 0\*/ 1 )+)" C- " 0F- 0 .%+ " .% " +/ \$" A1 (%0 4)& 6- (0 C%  
 %0+" \$6/ ' / V=W&1 )&1 / 4&/ & +/ 1 #- %&/ &#/ &%% KTU .%&/ 7) RO+" \$&- ' ) . / &% 3 \$1 " .%  
 (\$&+ : \$) . / (%\$' &+ : \$) . / A% %0+" \$6/ ' / KC2 1 / ' / &+ : \$) . / . )&+ : \$) . / A% %0+" \$6/ ' / UG  
 30 ! / & +/ 1 #- %&/ & .%0? \$ #/ .%0: +). / "- \$% Q+ / . )3\$% % 0 " " (- \$' 0R' 2 01 / . / .% -' ),'  
 .%& &+ .% " &?0 +> )+ " &4F- %+/ ' ( )% % . )3\$% (%& K4J. )&/ 7) RO+" \$&=

!" 1 )(\$' 1 )+)" 20 BI h A fZ dI W9C&' 0 & 1 )% 6\$ & 1 : &\$#\$&% ("()\* & .%0 3'1 0" .%0  
 :+). / "- \$% Q+ / =!" 1 )(\$' 1 )+)" %&- ' 3 \$1 "+/ "" (X- 1 / \$' 0#\$ .- +). / #/ \$ 1 )+\$ / \$?" )&1 / &

del género *Streptomyces*, incluyendo *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956. La cromomicina es producida, entre otros, por *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* ATCC 13276. La biosíntesis de mitramicina y cromomicina ha sido ampliamente estudiada en las cepas productoras previamente citadas.

- 5 Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención el agente inhibidor de sp1 se selecciona de la lista que comprende: mitramicina, cromomicina A3, olivomicina A, UCH9, durhamicina, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones. Alternativamente, se refiere a la mitramicina,
- 10 cromomicina A3, olivomicina A, UCH9, durhamicina o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la colestasis.
- 15 En otra realización más preferida de este aspecto de la invención el agente inhibidor de sp1 es la mitramicina, un compuesto de fórmula (I):



(I)

o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

5 Alternativamente, se refiere a la mitramicina o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o

10 tratamiento de la enfermedad colestasis.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del

15 alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse

20 mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de

- fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.
- 5
- 10 Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.
- 15 Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.
- 20
- 25 Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.
- 30

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

5 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

10 Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición  
15 separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención incluye composiciones  
20 farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de la invención descritos anteriormente junto a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para su administración, los compuestos se combinan normalmente con uno o más adyuvantes apropiados para la ruta de administración indicada. Los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato  
25 de magnesio, óxido de magnesio sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, y / o alcohol polivinílico. Alternativamente los compuestos de esta invención se pueden disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulos, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma  
30 de tragacanto, y / o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente puede incluir material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención además comprende otro principio activo. Aún más preferiblemente, al principio activo adicional se selecciona de colestiramina, ácido ursodeoxicólico, o una combinación de ambos.

5 Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, que comprende:

a) el compuesto de la invención,

b) un compuesto que se selecciona de entre colestiramina, ácido ursodeoxicólico, o una combinación de ambos.

10 Otro aspecto se refiere al uso de la preparación combinada de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la colestasis.

Debe enfatizarse que el término “preparación combinada” o también denominada “yuxtaposición”, en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la expresión “yuxtapuesta” implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

En esta memoria se entiende por “colestasis” la disminución o la ausencia del flujo normal de la bilis desde el hígado hasta el duodeno. La bilis fluye en condiciones normales desde las células hepáticas por un sistema colector representado por los conductos biliares intrahepáticos y los conductos hepáticos derecho e izquierdo. Estos se unen formando el conducto hepático común, al que se une la vesícula biliar. A partir de esta unión, el conducto biliar se denomina colédoco y desemboca en el duodeno. El hepático común y el colédoco juntos, constituyen la vía biliar intrahepática.

La colestasis puede dividirse en intra- y extrahepática, según donde se encuentre el trastorno. En las colestasis intrahepáticas existe dificultad en el flujo biliar en el hígado, mientras que en la extrahepática existe una obstrucción mecánica a nivel del colédoco. Las colestasis pueden ocurrir de forma aguda o recurrente en algunos casos, mientras que si persiste en el tiempo más de 6 meses se considera crónica. En la mayoría de las colestasis extrahepáticas la obstrucción se resuelve tras tratamiento quirúrgico, endoscópico o radiológico, por lo que rara vez son crónicas.

Casi cualquier enfermedad del hígado puede acompañarse de colestasis intrahepática transitoria: hepatitis víricas, toxicidad por fármacos, infecciones, enfermedades tumorales o situaciones fisiológicas como en el embarazo. Además, existen otras enfermedades poco frecuentes que afectan a los conductos biliares microscópicos del interior del hígado y que provocan de forma característica colestasis: son la cirrosis biliar primaria (CBP) y la colangitis esclerosante primaria (CEP).

Dentro de la colestasis extrahepática la coledocolitiasis (cálculos biliares en el interior del colédoco) es la causa más frecuente, pero también hay que tener en cuenta los tumores de la vía biliar y los pancreáticos.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende el compuesto de la invención o la composición de la invención.

En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones y formas farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio. Otras formas farmacéuticas pueden ser los sistemas coloidales, dentro de los cuales se incluyen nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas poliméricas.



Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

5 Las composiciones y formas farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

10 Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

15 La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

20 La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

25 Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

30 El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

(i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;

(ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;

(iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

5 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15





## Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201530576	
Fecha de recepción:	28 abril 2015, 17:55 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	900 796	
Solicitante:	Servicio Andaluz de Salud	
Número de solicitantes:	3	
País:	ES	
Título:	Uso de derivados de ácido antranílico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la colestasis.	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (22 p.) Reivindicaciones.pdf (2 p.) Resumen.pdf (1 p.) Dibujos.pdf (9 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=Gustavo Fuster 26814	
Fecha y hora de recepción:	28 abril 2015, 17:55 (CEST)	
Codificación del envío:	55:7E:20:C8:3C:52:77:64:4E:05:41:F6:90:98:7E:BD:F2:4E:DB:55	

---

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.  
Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/



<p>(1) MODALIDAD:</p> <p style="text-align: center;"><b>PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD</b></p>	<p style="text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>
<p>(2) TIPO DE SOLICITUD:</p> <p style="text-align: center;">PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL</p>	<p style="text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>
<p>(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:</p> <p style="text-align: center;">MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:</p>	
<p>4) LUGAR DE PRESENTACION:</p>	<p>OEPM, Presentación Electrónica</p>
<p>(5-1) SOLICITANTE 1:</p> <p style="text-align: center;">DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA</p> <p style="text-align: center;">NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME:</p> <p style="text-align: center;">DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:</p> <p>MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:</p> <p style="text-align: center;">INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESION:</p> <p style="text-align: center;">PORCENTAJE DE TITULARIDAD:</p> <p>(5-2) SOLICITANTE 2:</p> <p style="text-align: center;">DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA</p> <p style="text-align: center;">NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME:</p> <p style="text-align: center;">DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX:</p>	<p>Servicio Andaluz de Salud [ ]</p> <p>España ES Q9150013B</p> <p>Avda. de la Constitucion, 18 Sevilla 41 Sevilla 41071 España ES</p> <p style="text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>030,00 %</p> <p>Universidad de Córdoba <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>España ES Q1418001B</p> <p>Avda. Medina Azahara, 5 Córdoba 14 Córdoba 14004 España ES</p>

	CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	
	INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/>	
	PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	040,00 %
(5-3) SOLICITANTE 3:	DENOMINACIÓN SOCIAL: Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) UNIVERSIDAD PÚBLICA <input type="checkbox"/>  NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: G85296226 CNAE: PYME:	
	DOMICILIO: Monforte de Lemos, 5. Pabellón 11 LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28029 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX:	
	CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	
	INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/>	
	PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	030,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: Ferrín Sánchez NOMBRE: Gustavo NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 46816775-E	
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: De la Mata García NOMBRE: Manuel NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 30439400-G	
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: González Rubio NOMBRE: Sandra NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 46816775-E	
(6-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS: Muñoz Castañeda NOMBRE: Juan Rafael NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:	
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:		Uso de derivados de ácido antranílico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la colestasis.

(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERÍA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL:	APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE: NÚMERO DE PODER:	Fúster Gustavo 1039/1
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 22 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 9 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 8 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de figura(s): 0 <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/>
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:
(18) NOTAS:		
(19) FIRMA:		



FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:	Gustavo Fuster 26814
LUGAR DE FIRMA:	Madrid
FECHA DE FIRMA:	28 Abril 2015

**Identificación**

Ejercicio: 2015  
Nro Justificante: 7915110123961

**Sujeto Pasivo**

NIF/CIF:

Apellidos y Nombre o Razón Social:

**Agente o Representante legal (1):**

NIF/CIF: **33530042K**

Apellidos y Nombre o Razón Social: **FUSTER GUSTAVO**

Código de Agente o Representante (2): **1039**

**Autoliquidación**

Titular del expediente si es distinto del pagador: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD**

Modalidad Expediente: **P** Número Expediente: Tipo (3):

Clave: **IE01** Año: **2015** Concepto: **SOL. DE INVENCIÓN O REAHABILITACIÓN POR INTERNET**

Unidades: **1** Importe: **63,68**



Referencia OEPM: **85016893725**

909992100200185016893725


**Declarante**

Fecha: **28/04/15 17:14**

Firma: **FUSTER GUSTAVO**

**Ingreso**

Importe en euros: **63,68**

Adeudo en cuenta: 

NRC Asignado: **791511012396100000001**

Modelo CAIXA

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.  
(2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.  
(3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.

## **Uso de derivados de ácido antranílico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la colestasis.**

### **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso de inhibidores de la expresión del factor de transcripción Sp1, y más concretamente, se refiere al uso de un derivado del ácido antranílico, y específicamente del ácido tolfenámico, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la colestasis.

10

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La síntesis, secreción y reciclaje de las sales biliares representan las funciones del hígado cruciales para el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Durante la enfermedad hepática colestásica (CLD), los ácidos biliares tóxicos se acumulan en el suero y el hígado como consecuencia de su deficiente formación y la excreción en el canalículo de los hepatocitos, lo cual puede resultar en fibrosis, cirrosis e insuficiencia hepática crónica [1]. Se ha propuesto que el efecto deletéreo de la acumulación de ácidos biliares durante la colestasis está relacionada con el estrés oxidativo. Por lo tanto, la lesión hepática que se produce por la ligadura del conducto biliar se ha asociado con la disfunción mitocondrial, que es una importante fuente de especies reactivas del oxígeno (ROS), y perturbaciones en el sistema antioxidante [2] [3].

El óxido nítrico (NO) es un agente pleiotrópico bien conocido que influyen en múltiples aspectos de la fisiopatología hígado. Dependiendo de factores tales como su concentración o fuente de generación, el NO ha sido descrito como un mediador principal de daño hepático o como un potente protector contra la lesión hepática [4]. En el hígado, el NO pueden ser sintetizado por la actividad de las tres isoformas conocidas de la óxido nítrico sintasa (NOS), la isoforma endotelial (NOS 3) es considerada como la principal fuente de NO endógeno [5]. El uso de tratamientos moleculares asociados con el aumento de la de expresión de NOS-3 y la actividad en la CLD ha demostrado un efecto beneficioso para el hígado [6] [7]. Además, la administración de antioxidantes reduce la hepatotoxicidad de los ácidos biliares *in vitro* [8-10] e *in vivo* [3], a través de la prevención de la NOS-3 disminuir la expresión y la detoxificación de ROS [11]. Por lo tanto, la biorreactividad del NO mitiga el efecto de la

producción de ROS [12]. Además de su papel en la desintoxicación ROS, el NO puede actuar como un agente citoprotector mediante la inhibición de las caspasas a través de nitrosilación directa [13]. El ácido glucoquenodesoxicólico (GCDCA) es una sal biliar generada en el hígado a partir de ácido quenodesoxicólico y glicina, cuya toxicidad relativamente alta y la concentración en la bilis y el suero después de la colestasis ha ampliado su uso en modelos celulares de la enfermedad [8- 10]. Anteriormente, los autores de la presente invención han informado de que la expresión de NOS-3 se reduce en la línea celular de hepatocarcinoma HepG2 de humanos en respuesta a GCDCA, y que la recuperación de su expresión y la actividad está relacionada con la acción citoprotectora de moléculas antioxidantes[8] [9]. En la presente invención los autores han identificado a los elementos responsables de la regulación de la expresión de NOS-3 durante CLD, y han analizado el papel del estrés oxidativo en este proceso. Además, han aclarado los mecanismos moleculares subyacentes a la hepatocelular citotoxicidad relacionada con trastornos de colestasis lo que les ha permitido diseñar y desarrollar nuevas estrategias y tratamientos de intervención.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un **primer aspecto** de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende un agente inhibidor de sp1, de ahora en adelante composición de la invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la colestasis. Alternativamente, se refiere a una composición que comprende un agente inhibidor de sp1 para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la colestasis.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el agente inhibidor de sp1 es un derivado del ácido antranílico. Aún más preferiblemente, es un fenamato.

La familia del ácido antranílico comprende a un grupo de fármacos conocidos como fenamatos. Si bien la actividad biológica de este grupo de fármacos fue descubierta en la década de 1950, los fenamatos no han logrado amplia aceptación clínica. Con frecuencia causan efectos colaterales; en particular, puede ser muy grave. Uno de cada cuatro pacientes que los usan pueden presentar efectos colaterales, sobre todo gastrointestinales (dispepsia, diarrea, esteatorrea) y en raras ocasiones anemia hemolítica de tipo autoinmune, motivo por el cual están contraindicados en pacientes con antecedentes de esta naturaleza

Estructuralmente el ácido antranílico es un derivado del benceno, de la familia de los ácidos aminobenzoicos, dentro de los que se destacan los isómeros para y orto y es más común

encontrar la forma metilada del antranilato. Se presume que el ácido antranílico es precursor del indol, compuesto a partir del cual se abre un extenso mapa de reacciones dentro del que figuran la síntesis del aminoácido triptófano, la serotonina, etc.

Entre las sustancias incluidas dentro del grupo de los fenamatos se encuentran el:

5    Ácido tolfenámico,

      Ácido meclofenámico,

      Ácido flufenámico,

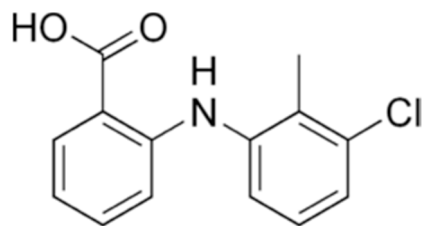
      Ácido mefenámico,

      Ácido niflúmico y

10    Ácido etofenámico.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención el agente inhibidor de sp1 se selecciona de la lista que comprende: ácido tolfenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido etofenámico, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones. Alternativamente, se refiere al ácido tolfenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido etofenámico, o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la colestasis.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención el agente inhibidor de sp1 es el ácido tolfenámico, un compuesto de fórmula (I):



25

(I)

o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones. Alternativamente, se refiere al ácido tolfenámico o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la enfermedad colestasis.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como

derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de

combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

- 5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de la invención descritos anteriormente junto a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para su administración, los compuestos se combinan normalmente con uno o más adyuvantes apropiados para la ruta de administración indicada. Los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, y / o alcohol polivinílico.

10 Alternativamente los compuestos de esta invención se pueden disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulos, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto, y / o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente puede incluir material de

15 retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención además comprende otro principio activo. Aún más preferiblemente, al principio activo adicional se selecciona de colestiramina, ácido ursodeoxicólico, o una combinación de ambos.

- 25 Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, que comprende:

- a) el compuesto de la invención,
- b) un compuesto que se selecciona de entre colestiramina, ácido ursodeoxicólico, o una combinación de ambos.

- 30 Otro aspecto se refiere al uso de la preparación combinada de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la colestasis.



Debe enfatizarse que el término “preparación combinada” o también denominada “yuxtaposición”, en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la expresión “yuxtapuesta” implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

En esta memoria se entiende por “colestasis” la disminución o la ausencia del flujo normal de la bilis desde el hígado hasta el duodeno. La bilis fluye en condiciones normales desde las células hepáticas por un sistema colector representado por los conductos biliares intrahepáticos y los conductos hepáticos derecho e izquierdo. Estos se unen formando el conducto hepático común, al que se une la vesícula biliar. A partir de esta unión, el conducto biliar se denomina colédoco y desemboca en el duodeno. El hepático común y el colédoco juntos, constituyen la vía biliar intrahepática.

La colestasis puede dividirse en intra- y extrahepática, según donde se encuentre el trastorno. En las colestasis intrahepáticas existe dificultad en el flujo biliar en el hígado, mientras que en la extrahepática existe una obstrucción mecánica a nivel del colédoco. Las colestasis pueden ocurrir de forma aguda o recurrente en algunos casos, mientras que si persiste en el tiempo más de 6 meses se considera crónica. En la mayoría de las colestasis extrahepáticas la obstrucción se resuelve tras tratamiento quirúrgico, endoscópico o radiológico, por lo que rara vez son crónicas.

Casi cualquier enfermedad del hígado puede acompañarse de colestasis intrahepática transitoria: hepatitis víricas, toxicidad por fármacos, infecciones, enfermedades tumorales o situaciones fisiológicas como en el embarazo. Además, existen otras enfermedades poco frecuentes que afectan a los conductos biliares microscópicos del interior del hígado y que provocan de forma característica colestasis: son la cirrosis biliar primaria (CBP) y la colangitis esclerosante primaria (CEP).

Dentro de la colestasis extrahepática la coledocolitiasis (cálculos biliares en el interior del colédoco) es la causa más frecuente, pero también hay que tener en cuenta los tumores de la vía biliar y los pancreáticos.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica

u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende el compuesto de la invención o la composición de la invención.

En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones y formas farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio. Otras formas farmacéuticas pueden ser los sistemas coloidales, dentro de los cuales se incluyen nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas poliméricas.

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

Las composiciones y formas farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

5 La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

10 La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

15 Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

20 El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

(i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;

25 (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;

(iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

30 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.





!"#%&'()\*+,-./:;<=>?@A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [ \ ] ^ \_ ` { | } ~ ¡ ¢ £ ¤ ¥ ¦ § ¨ © ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿

!"#\$%&'()\*+,-./:;<=>?@A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [ \ ] ^ \_ ` { | } ~ ¡ ¢ £ ¤ ¥ ¦ § ¨ © ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿

<p>PC) \$1&amp; %\$ "&amp;3,'#(%Q</p> <p>SS '0. %\$ 1\$ ' \$ 4',8*Q</p> <p>=-,',*. 1\$ ' \$ 4#&amp;1.Q</p>	<p>?NOERGEMLK</p> <p>NO * &amp;6,\$ ) 21\$ NOER9 EFQFL TU ! VW</p> <p>= ! ? @ @ . % 1, %</p>	
<p>X ( 1\$ - \$ 1\$ *',.Q</p> <p>X&amp;3,'#. *\$Q</p> <p>PC) \$1&amp; %\$ "&amp;3,'#. *\$ "Q</p> <p>? . 7"Q</p> <p>V7#(3&amp;Q</p>	<p>KOE ERM</p> <p>X\$ 16, ',&amp; A *% . 3 ( : %\$ X . 3 ( %</p> <p>G</p> <p>! X</p> <p>Y ! HZ [ AY = X Y ! I \ UZY = H ! VZP = ZU = ? AHA ! I VHAVA @ Z ! PV = Y !</p> <p>IA U = I ! XVAXZX</p>	
<p>Y&amp;' ( ) \$ *#&amp;" \$ *6, . %&amp;"Q</p>	<p>Y\$ " ' 1,4', &amp;* &gt;4% - TNN 4&gt;W</p> <p>H\$ ,6, *%, ' . ', &amp;* \$ " &gt;4% - TN 4&gt;W</p> <p>H\$ " ( ) \$ * &gt;4% - TE 4&gt;W</p> <p>Y, 2 (+&amp;" &gt;4% - TG 4&gt;W</p> <p>= IS]AHU ^Z [ ! &gt;: , 4</p>	<p>4. ' _ . &lt;\$ ]% . # . &gt; ; ) 3</p> <p>\$ " ]1\$ / ( \$ "# ; ) 3</p> <p>. 443, ' . #, &amp;* ]2&amp;%D&gt; ; ) 3</p> <p>\$ " ]- \$ \$ ] " O\$ \$ # ; ) 3</p> <p>- \$ \$ " O\$ \$ # &gt;4% -</p> <p>1\$ / ( \$ "# &gt;4% -</p>
<p>! *6, . %&amp;" 4&amp;1Q</p> <p>SS '0. D O&amp;1. %\$</p> <p>1\$ ' \$ 4',8*Q</p> <p>U&amp;%-, ' . ', 8* %\$ 3 \$ *67&amp;Q</p>	<p>UP ' a ( "#. 6&amp; S ( "#\$ 1 NMLEF</p> <p>NO * &amp;6,\$ ) 21\$ NOER9 EFQFL TU ! VW</p> <p>UKQRNQG YQKFGSQE bQb LQOFQY cQNYQR bQEGQRUQFKQ ! MQGLQNRQU RQESQKb</p>	

---

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.  
Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/





<p style="text-align: center;">CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:</p> <p>MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:</p> <p style="text-align: right;">INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/></p> <p>(5-3) SOLICITANTE 3:</p> <p style="text-align: right;">PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 033,30 %</p> <p style="text-align: right;">DENOMINACIÓN SOCIAL: Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) UNIVERSIDAD PÚBLICA <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: G85296226 CNAE: PYME:</p> <p style="text-align: right;">DOMICILIO: Monforte de Lemos, 5. Pabellón 11 LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28029 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:</p> <p>MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:</p> <p style="text-align: right;">INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 033,30 %</p>	
<p>(6-1) INVENTOR 1:</p> <p style="text-align: right;">APELLIDOS: de la Mata García NOMBRE: Manuel NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 30439400-G</p> <p>(6-2) INVENTOR 2:</p> <p style="text-align: right;">APELLIDOS: González Rubio NOMBRE: Sandra NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 46816775-E</p> <p>(6-3) INVENTOR 3:</p> <p style="text-align: right;">APELLIDOS: Ferrín Sánchez NOMBRE: Gustavo NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 44353484-P</p>	
<p>(7) TÍTULO DE LA INVENCION:</p>	<p>DERIVADOS DEL ÁCIDO RETINOICO PARA EL TRATAMIENTO DE LA COLESTASIS</p>
<p>(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:</p> <p style="text-align: right;">SI NO</p>	<p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/></p>

(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERÍA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPÓSITO: REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):		
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS: LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL:	APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE: NÚMERO DE PODER:	Fúster Gustavo 1039/1
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 22 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 13 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 3 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de figura(s): 0 <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/>
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:
(18) NOTAS:		
(19) FIRMA:	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:	Gustavo Fuster 26814 Madrid 20 Noviembre 2015





<b>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS</b>		
<b>Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad</b>		
<b>1. REFERENCIA DE SOLICITUD</b>	<b>901 156</b>	
<b>2. TASAS</b>	<b>Importe (en euros)</b>	
<b>Concepto</b>	<b>Código de barras asignado</b>	<b>Importe</b>
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	85019170809	63,68
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET		0,00
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge al aplazamiento de tasas previsto en el art. 162 de la Ley 11/1986 de Patentes	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	<b>Importe total</b>	63,68
	<b>Importe abonado</b>	63,68

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

!"#\$%&' ( ! " ) \* + \$ ' # " , \$ ' \$ ' . & # & " ) , # & , & / \$ - , ' ! " ) & + ' ) " ( , & ( \$

+ & / . ' ! " ) & \$ % " - + \$ -

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso de un inhibidor del factor de transcripción AP-1 en la elaboración de un medicamento para el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica. Preferiblemente el inhibidor de AP-1 es un derivado del ácido retinoico, y más preferiblemente es el SR 11302.

& - , " + " ! " - , " ( ! " ) & \$ % " - + \$ -

Las enfermedades hepáticas colestásicas (EHC) incluyen un grupo de diversos trastornos con diferente epidemiología, fisiopatología, evolución clínica y pronóstico, que se caracterizan por un defecto en la formación de ácidos biliares y/o en su transporte desde el hígado hasta el intestino. La colestasis puede ser clasificada como intra o extrahepática, dependiendo de si se produce como resultado de la disfunción o deterioro de los conductos biliares intrahepáticos, o afecta a los conductos biliares extrahepáticos, respectivamente. En cualquier caso, la acumulación de ácidos biliares tóxicos en el suero e hígado de los pacientes con colestasis puede dar lugar a fibrosis, cirrosis e insuficiencia hepática crónica. Por lo tanto, las consecuencias de la colestasis son muy graves y, si no se trata, progresará invariablemente hacia el trasplante de hígado (Liver EAftSot. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J. Hepatol.* 2009; 51:237-67).

El ácido ursodesoxicólico (UDCA) ha demostrado ejercer un efecto anticolestásico en varios trastornos colestásicos, y es el tratamiento de elección en la cirrosis biliar primaria, la cual representa la causa principal de las enfermedades biliares de pequeños conductos. El efecto beneficioso de UDCA se ha asociado con la inhibición de la apoptosis inducida por ácidos biliares en hepatocitos y colangiocitos, así como una mejor supervivencia del paciente (Paumgartner G. y Beuers U., 2002. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology.* 36:525-31). Sin embargo, algunas consideraciones deben ser tenidas en cuenta sobre el uso de UDCA en el tratamiento de las EHC. Así, UDCA es frecuentemente combinado con, o reemplazado por, otros agentes terapéuticos tales como los corticoesteroides, inmunosupresores y otros

fármacos (Liver EEAftSot. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J. Hepatol.* 2009; 51:237-67).

El óxido nítrico (NO) puede actuar como un mediador principal de daño hepático o como un potente protector frente a la lesión tisular, dependiendo de factores tales como su concentración o la fuente que lo genera (Clemens MG, 1999. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 30:1-5). El compuesto químico 2-(acetiloxi) benzoico 3-(nitrooximetil) fenil éster (NCX-1000) es un derivado del UDCA que libera ON de manera selectiva en el hígado y protege frente al desarrollo de hipertensión portal (Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, et al., 2001. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 98:8897-902). La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (NOS-3) es considerada la principal fuente de ON endógeno en el hígado, y su expresión también ha sido relacionada con un papel protector (Biecker E, Trebicka J, Kang A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Heller J. (2008). Treatment of bile duct-ligated rats with the nitric oxide synthase transcription enhancer AVE 9488 ameliorates portal hypertension. *Liver Int.* 28:331-8; Lee KC, Yang YY, Huang YT, Lee FY, Hou MC, Lin HC (2010). Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability. *Clin Sci (Lond).* 119:45-55). Recientemente, hemos demostrado que el factor de transcripción (FT) SP1 regula negativamente la expresión de NOS-3 durante la colestasis inducida por ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA) a través de la unión directa al promotor de NOS-3 (pNOS-3), de manera dependiente al estrés oxidativo. En este sentido, la inhibición específica de SP1 resultó en el aumento de la expresión de NOS-3 y la reducción de parámetros relacionados con la muerte celular, siendo propuesto como una nueva diana potencial en el tratamiento de las EHC (González-Rubio S., López-Sánchez L., Muñoz-Castaneda J., Linares C.I., Aguilar-Melero P., Rodríguez-Perálvarez M., (2015). GCDCA down-regulates gene expression by increasing Sp1 binding to the NOS-3 promoter in an oxidative stress dependent manner. *Biochem. Pharmacol.* 96:39-51). Aquí, hemos investigado la participación de nuevos sitios de unión de FTs (SUFTs) para AP-1, GATA-1 y GATA-4 en la regulación de la expresión de NOS-3 durante la colestasis experimental en la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de un inhibidor del factor de transcripción AP-1 en la elaboración de un medicamento para el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica, o alternativamente, se refiere a un  
5 inhibidor del factor de transcripción AP-1 para su uso en el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor del factor de transcripción AP-1 es un derivado del ácido retinoico o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus  
10 combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor del factor de transcripción AP-1 es un derivado del ácido retinoico que se selecciona de la lista que consiste en: SR 11302, SR 11238, SR 11327, SR 11220 y SR11228.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor del factor de transcripción AP-1 es el SR 11302.  
15

## **COMPOSICIÓN DE LA INVENCION**

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende al menos un inhibidor del factor de transcripción AP-1, y aún más preferiblemente que consiste en un inhibidor del factor de transcripción AP-1.  
20

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor del factor de transcripción AP-1 es un derivado del ácido retinoico, preferiblemente es el SR 11302.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende al menos otro principio activo.  
25

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento para el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica, o alternativamente a la composición de la invención para su uso para en el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende la composición de la invención, y aún más preferiblemente que consiste en la composición de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la forma farmacéutica de la invención se selecciona de la lista que consiste en: emplasto, pomada, pasta, crema, solución, suspensión, emulsión, loción, linimento, gel, hidrogel, hidrocoloide, espuma, polvo, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente la forma farmacéutica de la invención es una solución o suspensión.

## 15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Expresión de los factores de transcripción cJun y cFos en las células tratadas con GCDCA. (A) Efecto de la administración of MnTBAP o mitoQ (12 h). Imágenes representativas para la expresión de fosfo (p)-cJun (n=4 y 3, respectivamente) y p-cFos (n=4 y 5, respectivamente) en lisados celulares de HepG2. (B) Efecto de la administración de curcumina o quercetina sobre la expresión de p-cJun, p-cFos y p-SP1 (6 h).

**Figura 2.** Papel de AP-1 en la regulación de NOS-3 durante la citotoxicidad por GCDCA. Células expuesta o no a GCDCA fueron tratadas con curcumina, quercetina o SR-11302. (A) Actividad del promotor de NOS-3 (pNOS-3) (n=6). (B) Expresión de la proteína NOS-3 (n=3). (C) Actividad caspasa-3 (n=4). Los parámetros fueron determinados a 6 ó 17 h tras el tratamiento. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control\* o frente al grupo de tratamiento con GCDCA# están marcadas.

**Figura 3.** Unión de los factores de transcripción cJun y cFos al promotor de NOS-3 (pNOS-3). (A) Expresión génica de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y NOS-3 como controles positivos. (B) Unión de cJun y cFos al pNOS-3 en la posición -666. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control\* están marcadas.



## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han obtenido una serie de resultados que muestran el efecto de un derivado del ácido retinoico, concretamente el SR 11302, para producir la inhibición del factor de transcripción AP-1, restaurar la expresión de la oxido nítrico sintasa endotelial (NOS-3) y reducir el daño celular causado por la administración del principal ácido biliar humano, el ácido glicoquenodeoxicólico (GCDCA). De esta manera, el SR 11302 podría resultar útil para el tratamiento de las enfermedades hepáticas colestásicas.

### USO DEL COMPUESTO DE LA INVENCION

10 Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de un inhibidor del factor de transcripción AP-1 en la elaboración de un medicamento para el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica, o alternativamente, se refiere a un inhibidor del factor de transcripción AP-1 para su uso en el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor del factor de transcripción AP-1 es un derivado del ácido retinoico o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor del factor de transcripción AP-1 es un derivado del ácido retinoico que se selecciona de la lista que consiste en: SR 11302, SR 11238, SR 11327, SR 11220 y SR11228.

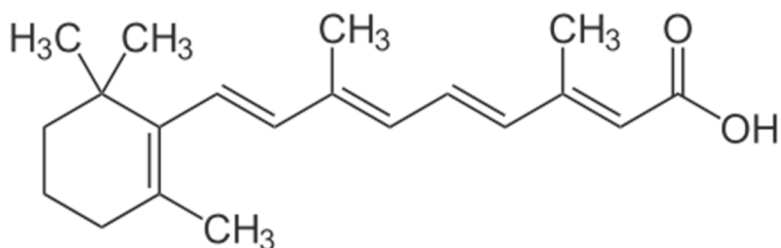
En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor del factor de transcripción AP-1 es el SR 11302.

En esta memoria se entiende por “factor de transcripción AP-1” a la Proteína Activadora 1 (AP-1). Esta proteína es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por proteínas pertenecientes a las familias de c-Fos, c-Jun, ATF y JDP. AP-1 está implicada en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones virales o bacterianas. De esta manera, AP-1 controla, distintos procesos celulares incluyendo la diferenciación, proliferación y apoptosis.

AP-1 es un factor de transcripción que tiene la capacidad de activar la transcripción de los genes que contienen elementos de respuesta a 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), caracterizados por la secuencia 5'-TGAG/CTCA-3'. AP-1 se une al ADN por medio de una región de su secuencia rica en aminoácidos básicos, mientras que la estructura dimérica está formada por una cremallera de leucina.

En la presente invención se entiende por “enfermedad hepática colestásica” al conjunto de enfermedades que provocan un daño hepático como consecuencia de un defecto en el flujo de la bilis desde el hígado hasta el duodeno. A esta condición se la denomina colestasis, y puede ser de dos tipos: obstructiva y metabólica. Mientras que la primera de ellas se caracteriza por la existencia de un bloqueo mecánico en el sistema de conductos, y se puede producir a partir de un cálculo biliar o malignidad, la colestasis metabólica se produce a partir de perturbaciones en la formación de bilis, que pueden ocurrir debido a defectos genéticos o adquiridos.

El ácido retinoico (AR) es un metabolito de la vitamina A. El AR se requiere por todos los animales superiores como los peces y los humanos. Tiene un papel fundamental en el desarrollo embrionario. Su fórmula desarrollada es la siguiente:



Fórmula (I)

El AR se obtiene del retinol (vitamina A), que se sintetiza en los animales pero que tiene un origen vegetal ya que proviene del  $\beta$ -caroteno. Una vez el  $\beta$ -caroteno ha sido ingerido, se adhiere en el lumen del intestino por la  $\beta$ -caroteno dioxigenasa y se inicia el proceso síntesis del ácido retinoico.

El AR es necesario para impedir la síntesis de queratina de alta masa molecular. Se ha demostrado que los animales con deficiencia de vitamina A son más susceptibles a padecer cáncer debido al potencial antioxidante del  $\beta$ -caroteno y a los efectos que ejercen el retinol y el ácido retinoico en la regulación celular. Interviene en la producción de mucus en las células epiteliales. El AR también participa en los mecanismos que controlan la reacción inflamatoria, ya que ha sido relacionado con la generación y la expresión de óxido nítrico,

prostaglandinas, interleucina y citosinas. Estas sustancias actúan en la generación o el mantenimiento del dolor debido a la inflamación. También son sustancias diana para muchos analgésicos. Por otro lado, actúa como agente protector del daño oxidativo en las mitocondrias.

5 El derivado del ácido retinóico puede incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros,  
10 racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza  
15 incluye cualquier derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un  
20 compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede  
25 llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

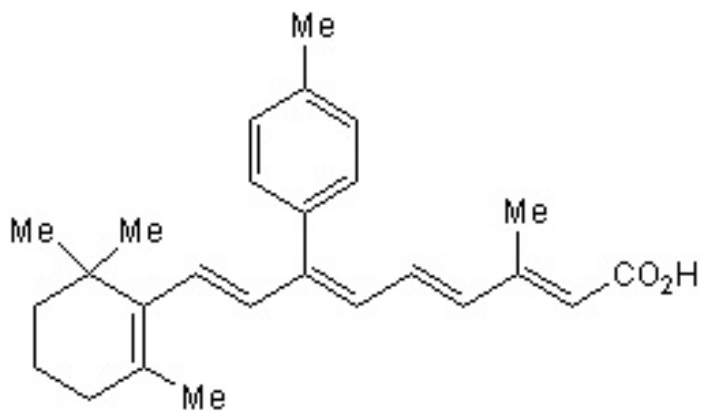
Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la  
30 preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

El derivado del ácido retinoico puede estar en forma cristalina como compuesto libre o como solvato. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no

"+%#("60%&4 0 & +-"0& #- % % &%\$ i()0& % 0 #\$/#" \$ +), ' .% & 0" (/ & / &"0& 3 \$1 "+Y- ()+" 1 % (%"+%#("60%>!" ' "(-\$ 04" . %0& 0" (/ 3 \$1 "+Y- ()+" 1 % (%"+%#("60% / %& +\$1)+) &)%1 #\$\$2+ -" ' . / &% 3 \$1 "+Y- ()+" 1 % (%"+%#("60% E' -' " \$%' QL" +), ' #"\$)+- 0 \$4 %0& 0" (/ %& -' 5). \$' (/ >!/ & & 0" (/ & #- % % / 6(% %& % #/ \$ 1 Y(/ . / & +/ ' \*% +)' "0& . % & 0" (" +), ' +/ ' / +). / & #/ \$0 & %M#%&/ & % 0 1" (%\$)">

8"\$ & "#0+" +), ' % (%\$ #)" 4%0. %\$\*" . / . %0=+). / \$%( / )+ 4 & & &"0&4 # \$ 3=\$1 "+ / & / & 0" (/ &4 &% % +/ (' \$ \$' 4 # \$ % % % (%1 % (%4 % -" 3 \$1 " 3 \$1 "+Y- ()+" 1 % (%"+%#("60% / & &"' +) 01 % (%#- \$ 4%& . %& \$4K- (%)% %- ' ) \*%0. %#- \$4" 3 \$1 "+Y- ()+" 1 % (%"+%#("60% %M+ 2% . / 0 & " . ) \* / & 3 \$1 "+Y- ()+ / & ' / \$1 "0& ("0& +/ 1 / . ) 2% (%& 2 #/ \$" . / \$%4 2 ' / ) +0 2% . / 1" (%\$) 0+ / ' &). %\$ . / (, M+ / " ' ) \*%0& . % . / & 3+ " +), ' ' / \$1 "0& > ! / & ' ) \*%0& . % #-\$4" #"\$ %0#\$) +#) "+(\* / & ' # \$ % % % 60%1 % (%& # % \$) \$%& "0Pbt 41 = & # \$ % % % 60%1 % (% & # % \$) \$%& "0Sbt 42 (/ . " \*J' 1 = & # \$ % % % 60%1 % (%& # % \$) \$%& "0Pbt > E' -' " \$%' QL" +), ' # \$ % % % . " 4 & ' & # % \$) \$%& "0Prt . % + / 1 # - % & / . % 3 \$1 - 0 D14 / . % & & &"0&4 & 0" (/ & / # \$ 3=\$1 "+ / &>

15 E' %&" 1 %1 / \$" 0 @ : : ABCp &% \$ % % % % " -' + / 1 # - % & / K- J1 )+ / . % 3 \$1 - 0 GctFAd c4 (" 1 6)Y' . % / 1 ) " . / cu+). / DE44/EH91 % ( ) 9S9 91 % ( ) 0% ) 0P904449(\$1 % ( ) 9+ ) 0 5% M% / 9 : 92044 44 9 / ' " (%\$ % / )+ p4 +/ ' ZwG7? : TB: TC9 CR 2 8-6G5%1 PPST f C 2 . % # % & / 1 / 0+ - 0 \$AST4f 1 < / 0? - 3 \$1 - 0 % & 0 & ) - ) % ( %



20 ^, \$1 - 0 D1H

## COMPOSICIÓN DE LA INVENCION

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende al menos un inhibidor del factor de transcripción AP-1, y aún más preferiblemente que consiste en un inhibidor del factor de transcripción AP-1.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor del factor de transcripción AP-1 es un derivado del ácido retinoico, preferiblemente es el SR 11302.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende al menos otro principio activo. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el principio activo se selecciona de la lista que consiste en: ácido ursodesoxicólico (UDCA), corticosteroides, inmunosupresores o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

La composición farmacéutica de la invención comprenderá al menos un compuesto de la invención, y preferiblemente comprenderá una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

## USOS DE LA COMPOSICIÓN DE LA INVENCION

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento.

5 Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento para el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica, o alternativamente a la composición de la invención para su uso para en el alivio, mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad hepática colestásica.

## 10 FORMA FARMACÉUTICA DE LA INVENCION

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende la composición de la invención, y aún más preferiblemente que consiste en la composición de la invención.

15 En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones y formas farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o 20 soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio. Otras formas 25 farmacéuticas pueden ser los sistemas coloidales, dentro de los cuales se incluyen nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas poliméricas.

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

30 Las composiciones y formas farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la

invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

5 Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, mejora, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

10 La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

15 La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0,001 y 1000 mg/Kg/día, o entre 0,1 y 500 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

20 Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la forma farmacéutica de la invención se selecciona de la lista que consiste en: emplasto, pomada, pasta, crema, solución, suspensión, emulsión, loción, linimento, gel, hidrogel, hidrocoloide, espuma, polvo, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente la forma farmacéutica de la invención es una solución o suspensión.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los





